



Universidade de Aveiro
Ano 2014

Departamento de Biologia

Vanessa Sofia
Antunes Farias

Cinética da Apoptose Induzida
pelos vírus *Influenza A*

DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos académicos.



Universidade de Aveiro
Ano 2014

Departamento de Biologia

Vanessa Sofia
Antunes Farias

Cinética da Apoptose Induzida pelo vírus
Influenza A

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica de Prof. Doutora Helena Paula Henriques Rebelo de Andrade, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, e Coorientação de Prof. Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Trabalho realizado no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge de Lisboa, no Laboratório de Resistência aos Antivirais do Departamento de Doenças Infecciosas

Apoio financeiro da FCT e do FSE no âmbito do III Quadro Comunitário de Apoio



o júri

Presidente

Prof. Doutor Carlos Miguel Miguez Barroso
Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Daniela Maria Oliveira Gandra Ribeiro
Investigadora Principal do Centro de Biologia Celular do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Helena Paula Henriques Rebelo de Andrade
Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

Prof. Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso
Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos:

Com a realização deste trabalho fecha-se mais um ciclo importante na minha vida, pelo que não posso deixar de expressar aqui os meus sinceros agradecimentos a todos os que de alguma forma contribuíram para este trabalho, a todos os que me ajudaram e apoiaram.

Um agradecimento especial à Professora Doutora Helena Rebelo de Andrade, que desde logo aceitou a orientação deste trabalho, pela competência com que orientou esta tese e o tempo que generosamente me dedicou, pela transmissão de conhecimentos e pela crítica e sugestões prestadas no decorrer do trabalho.

Ao Luís Santos, aluno de doutoramento pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, pelo apoio incondicional neste trabalho, pelas críticas e sugestões feitas durante a orientação, pela disponibilidade sempre revelada e confiança demonstradas e por todo o conhecimento que me transmitiu neste processo de aprendizagem.

À Vanessa Correia, aluna de doutoramento pela Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, pela simpatia, amizade demonstrada, confiança, total disponibilidade e por todo o apoio e motivação.

À Professora Doutora Sónia Mendo, coorientadora deste trabalho, professora e investigadora nesta instituição, pelo auxílio e disponibilidade prestada.

À minha mãe Maria de Fátima Farias e ao meu pai Manuel Farias por nunca me deixarem desistir, por tudo o que até hoje me ensinaram e a quem devo tudo o que sou. Todo o seu esforço e dedicação são uma fonte de inspiração e motivação para o presente e o futuro.

À minha irmã, Joana Farias, por tudo o que ela significa.

Ao meu namorado, Pedro Lourenço, por todo o apoio demonstrado, pela compreensão e por todos os momentos bons que me proporcionou ao longo deste trabalho.

À Cátia Mendes por ser uma fonte de inspiração e motivação, assim como pela amizade demonstrada ao longo destes 20 anos.

À Vânia de Araújo por tudo o que me ensinou, por toda a ajuda incondicional, e pela amizade.

Aos meus amigos em especial à Raquel Espirito Santo, à Neide Margarido e aos três Tiagos por serem mais que uma família que fui construindo ao longo dos anos. Pelo estímulo e confiança, fazendo-me acreditar que era possível chegar ao fim com sucesso

E de um modo geral a todos aqueles que direta ou indiretamente me foram ajudando, fornecendo informações, ideias e críticas, algumas das quais essenciais para o trabalho.

palavras-chave:

Influenza A, Apoptose, Morte celular, Patogenicidade e Virulência

resumo:

A gripe é uma infecção respiratória, com elevada importância na saúde pública, provocada pelo vírus *Influenza*. Estima-se que anualmente as epidemias causem 35 milhões de casos graves de gripe e 250-500 mil mortes mundialmente.

Os vírus *influenza A* estão associados a uma elevada capacidade evolutiva. Diversos estudos sugerem que o vírus evoluiu no sentido de equilibrar os processos apoptóticos durante a infecção, com base na presença de proteínas virais que desempenham funções anti e/ou pró-apoptóticas. A apoptose é um mecanismo celular que, quando ativado leva à morte celular de uma forma controlada e pode estar associado à defesa da célula como resposta a uma infecção viral. Neste contexto, definiu-se como objetivo principal deste projeto, analisar quantitativamente a cinética da morte celular total e da apoptose em infecções por vírus *Influenza A* de dois subtipos diferentes (A(H₃N₂) e A(H₁N₁)pdm09).

Com o intuito de cumprir os objetivos propostos, no decurso deste trabalho foram constituídos *stocks* das estirpes virais através do isolamento e propagação das diferentes estirpes de vírus *Influenza* em células MDCK-SIAT1. A cinética da morte celular total e da apoptose foi avaliada através da infecção *in vitro*, do mesmo tipo de células, com a finalidade de analisar e quantificar, no período pós-infecção, a morte celular total e a apoptose, através de ensaios de citotoxicidade (técnica de LDH - lactato desidrogenase) e pela coloração de Hoescht, respetivamente.

Com este estudo observou-se (1) a inibição da morte celular na fase inicial da infecção (primeiras 24-32 hpi) nos dois subtipos estudados e (2) diferenças na morte celular induzida pelo subtipo A(H₁N₁)pdm09 e A(H₃N₂) na fase tardia da infecção. Nomeadamente, em A(H₁N₁)pdm09 observa-se morte celular maioritariamente pela via apoptótica, contrariamente ao registado em A(H₃N₂).

Até à data este é o primeiro estudo em que se avalia as diferenças na cinética da apoptose entre os vírus *Influenza A* dos subtipos A(H₃N₂) e A(H₁N₁)pdm09. O desenvolvimento desta área de trabalho pode contribuir para o conhecimento da cinética da apoptose como um dos mecanismos base do sucesso replicativo dos vírus *Influenza* que se poderá refletir nas diferenças de virulência e patogenicidade encontrada nos vários tipos e subtipos. Este modelo de estudo poderá, ainda, contribuir para a investigação de novos alvos antivirais assim como para o desenvolvimento de novas estratégias de controlo do vírus *Influenza*.

keywords *Influenza A, Apoptosis, Cell Death, Pathogenicity and Virulence*

abstract The flu is a respiratory infection, with high public health importance, caused by the *Influenza virus*. It is estimated this epidemics cause, annually, 35 million cases of severe influenza and 250-500 thousand deaths worldwide.

Influenza A virus are associated with a high ability to evolve. Several studies suggest that the virus has evolved in order to balance apoptotic processes during infection based on the presence of viral proteins that play anti and/or pro-apoptotic functions. Apoptosis is a cellular mechanism which, when activated, leads to cell death in a controlled manner and can be associated with the defense of the cell in response to a viral infection. In this context, it was defined as the main objective of this project, to quantitatively analyze the kinetics of total cell death and apoptosis in *Influenza A* virus infections by two different subtypes, (A(H₃N₂) and A(H₁N₁) pdm09).

Aiming to fulfill the proposed objectives, in the course of this work, stocks of viral strains were established by isolation and propagation of different strains of influenza virus in MDCK-SIAT1 cells. The kinetics of total cell death and apoptosis was evaluated by *in vitro* infection of the same cell line. In order to analyze and quantify the post-infection period, total cell death and apoptosis was assed using cytotoxicity assays (Technical LDH - *lactate dehydrogenase*) and Hoechst staining, respectively.

In this study, it was observed (1) a inhibition of cell death in early stage of infection (within the first 24-32 hpi) in both subtypes studied and (2) differences in cell death induced by subtype A(H₁N₁)pdm09 and A(H₃N₂) in the late phase of infection. Namely, in subtype A(H₁N₁)pdm09 it is observed cell death by the apoptotic pathway, contrary to that for subtype A(H₃N₂).

So far, this is the first study that assesses differences in the kinetics of apoptosis among *Influenza A* virus subtypes A(H₃N₂) and A(H₁N₁)pdm09. The development of this area of work can contribute to the knowledge of the kinetics of apoptosis as one of the basic mechanisms of replicative success of influenza viruses that may reflect differences in virulence and pathogenicity found in many types and subtypes. This study model may also contribute to the research of new antiviral targets as well as for the development of new strategies for control of *Influenza* virus.

Índice

Lista de Símbolos e Abreviaturas	XIX
Lista de Figuras	XXV
Lista de Tabelas	XXVII
Introdução	1
1. A Gripe	1
2. Vírus <i>Influenza</i>	3
2.1. Classificação e Nomenclatura	3
2.2. <i>Diferenças Entre Géneros Influenza</i>	4
2.3. Morfologia e Estrutura de <i>Influenza A</i>	4
2.4. Organização Genómica	6
2.5. Ciclo Replicativo	9
2.6. Evolução dos Vírus <i>Influenza A</i>	12
3. Resposta Imune à Infeção por Vírus <i>Influenza A</i>	15
3.1. <i>Resposta Imune Inata</i>	16
3.2. <i>Resposta Imune Adaptativa</i>	16
4. Morte Celular	17
4.1. Necrose	18
4.2. Apoptose	18
5. <i>Influenza A</i> e Apoptose	21
Objetivos	22
Objetivo Principal	22
Objetivos específicos	22
Material e Métodos	23
1. Cultura Celular	23
1.1. Descongelação de Células	25

1.2.	Manutenção da Cultura.....	26
1.3.	Passagem de Células	26
1.4.	Determinação da Concentração Celular	28
2.	Constituição dos Stocks Virais	29
2.1.	Propagação das Estirpes Virais.....	30
2.2.	Reação de Hemaglutinação.....	31
2.3.	Determinação do TCID50	33
3.	Ensaio de Morte Celular	36
3.1.	Morte Celular Total	36
3.2.	Apoptose	37
3.3.	Tratamento de Dados.....	40
	Resultados.....	41
1.	Padronização da Concentração Celular.....	41
2.	Constituição dos Stocks Virais	42
2.1.	Isolamento das Estirpes Virais.....	42
2.2.	Determinação do TCID50 das Estirpes Virais	43
3.	Cinética da Morte Celular e da Apoptose Após Infecção pelos Vírus <i>Influenza A</i>	44
3.1.	Cinética da Morte Celular Total	44
3.2.	Cinética da Apoptose na Infecção por Influenza A	49
3.3.	Comparação da Morte Celular Total e Apoptose.....	54
	Discussão.....	56
	Referências bibliográficas	59

Lista de Símbolos e Abreviaturas

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µl	Microlitro
°C	Graus Celsius
Apaf-1	<i>Apoptotic Protease Activating Factor 1</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
Ca ⁺²	Íon Cálcio
Caspases	<i>Cystein Aspartic Acid-Specific Proteases</i>
cm ²	Centímetro Quadrado
CO ₂	Dióxido de Carbono
cRNA	<i>complementary Ribonucleic Acid</i>
CTL	Linfócitos T Citotóxicos
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DDI	Departamento de Doenças Infeciosas
DISC	<i>Death-Inducing Signaling Complex</i>
D-MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FADD	<i>Fas Associated Death Domain</i>
FBS	Fetal Bovine Serum
G418	Geneticina
HA	Hemaglutinina
HEF	Hemaglutinina-Esterase- Fusão
Hepes	<i>N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic acid</i>
Hoescht	<i>2'-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazole trihydrochloride hydrate</i>
hpi	Horas Pós-infecção
ICTV	<i>Committee on Taxonomy of Virus</i>
INF	Interferão
INSA	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
INT	Iodofenil-Nitrofenil Tetrazolio
L	Litro

LDH	Lactato Desidrogenase
M	Molar
M1	Proteína da Matriz
MDCK-SIAT1	<i>Madin-Darby Canine Kidney α-2,6-Sialyltransferase</i>
Mg	Miligrama
Mg ⁺²	Íon Mágnesio
MHC	Complexo de Histocompatibilidade
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	<i>Milímetro</i>
MM32	Meio de Manutenção a 32 °C
mRNA	<i>messenger Ribonucleic Acid</i>
NA	Neuraminidase
NAD ⁺	Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
NEAA	<i>Non-Essential Amino Acid</i>
NEP	Proteína de Exportação Nuclear
NK	<i>Natural Killer</i>
nm	<i>Nanómetros</i>
NP	Nucleoproteína
NS	Proteína Não Estrutural
OMS	Organização Mundial de Saúde
<i>P</i>	<i>P-value</i>
PA	Polimerase Ácida
PB	Polimerase Básica
pdm	Pandémico
PFA	Paraformaldeído
pH	Potencial de Hidrogénio
PI3K	<i>phosphatidylinositol-3-kinase</i>
PSN	<i>Penicillin-Streptomycin-Neomycin</i>
RNP	Complexo Ribonucleoproteico
RNPs	Ribonucleoproteínas
Rpm	Rotações por Minuto
-ssRNA	<i>negative-sense single-stranded Ribonucleic Acid</i>
TCID ₅₀	<i>50% Tissue Culture Infectious Dose</i>
TLR	Recetores <i>Toll-like</i>
TPCK	<i>Tosylphenylalanylchloromethane</i>

TRADD	<i>Tumor associated death domain</i>
UID	Unidade de Investigação e Desenvolvimento
USA	<i>United States of America</i>
UV	Radiação Ultravioleta
vRNA	<i>viral Ribonucleic Acid</i>

Lista de Figuras

Figura 1 - Taxa de incidência da síndrome gripal por 100.000 habitantes e tipo de vírus Influenza predominante em cada época desde 2007 até 2014.	2
Figura 2- Estrutura do Complexo Ribonucleoproteico.	5
Figura 3- Estrutura do virião de <i>Influenza A</i>	5
Figura 4- Organização genômica dos vírus Influenza A.	6
Figura 5- Ciclo replicativo dos vírus <i>Influenza A</i>	9
Figura 6- Alterações antigénicas <i>Major (Shift)</i> e <i>Minor (Drift)</i>	13
Figura 7- Mecanismos associados às alterações antigénicas <i>major</i> , responsáveis pelas pandemias de gripe.	14
Figura 8- Resposta celular à infeção por vírus <i>Influenza A</i>	15
Figura 9- Diferenças morfológicas entre Necrose e Apoptose.	17
Figura 10- Vias Apoptóticas.	20
Figura 11- Quadrantes da câmara de Neubauer.	27
Figura 12- Fórmula da concentração da suspensão celular	28
Figura 13- Reação de Hemaglutinação.	32
Figura 14- Reação de Hemaglutinação	32
Figura 15- Determinação do TCID ₅₀	33
Figura 16. Reação química na qual se baseia o kit <i>CytoTox 96®Non-Radioactive Cytotoxicity Assay</i>	37
Figura 17- Células MDCK-SIAT1 coradas com Hoechst 33258	38
Figura 18 - Identificação de núcleos de células MDCK-SIAT1 em apoptose por coloração de Hoechst 33258	39
Figura 19- Liberação de LDH ao longo de 72 horas pós-infeção com a estirpe viral A/Portugal/50/2012 (H ₃ N ₂)..	45
Figura 20- Liberação de LDH ao longo de 72 horas pós-infeção com a estirpe viral A/Portugal/55/2013(H ₁ N ₁)pdm09.	46
Figura 21- Liberação de LDH ao longo de 72 horas pós-infeção com as estirpes virais A/Portugal/50/2012(H ₃ N ₂) e A/Portugal/55/2013(H ₁ N ₁)pdm09 para cada diluição em estudo.	48
Figura 22- Núcleos de células MDCK-SIAT1 infetadas com vírus <i>Influenza A</i> do subtipo A(H ₁ N ₁)pdm09 corados com Hoechst 33258 e observados por microscopia de fluorescência.	49
Figura 23 – Percentagem de células em apoptose ao longo de 72 horas pós-infeção com a estirpe viral A/Portugal/50/2012(H ₃ N ₂)..	50

Figura 24 – Percentagem de células em apoptose, ao longo de 72 horas pós-infecção com a estirpe A/Portugal/55/2013 (H ₁ N ₁)pdm09..	51
Figura 25- Comparação da percentagem de células em apoptose, ao longo de 72 horas pós-infecção entre a estirpe A/Portugal/50/2012(H ₃ N ₂) e a estirpe A/Portugal/55/2013(H ₁ N ₁)pdm09..	53
Figura 26- Comparação da libertação de LDH e da percentagem de células em apoptose, ao longo de 72 horas pós-infecção.....	55

Lista de Tabelas

Tabela 1- Diferenças entre as epidemias sazonais e pandemias.....	2
Tabela 2 - Diferenças entre os géneros <i>Influenza A, B e C</i>	4
Tabela 3-Pandemias de Gripe.	14
Tabela 4- Meios de cultura utilizados	24
Tabela 5- Recipientes de cultura celular	29
Tabela 6- Modelo para o cálculo do TCID ₅₀ pelo método de <i>Reed-Muench</i>	34
Tabela 7- Historial de propagação dos stocks virais com os respetivos resultados das reações de hemaglutinação.....	42

Introdução

1. A Gripe

A gripe é uma infecção respiratória, com elevada importância na saúde pública, provocada pelo vírus *Influenza*. Ocorre normalmente nos meses de inverno (no hemisfério norte). Fatores populacionais, ambientais e do próprio vírus são apontados como possíveis causas das diferenças associadas à gravidade das infecções provocadas pelo vírus *Influenza* e à incidência da doença.(1-4)

As manifestações clínicas da gripe diferem na duração e intensidade dos sinais e sintomas e dependem do hospedeiro e do tipo viral. Os principais sintomas de gripe sazonal são: febre alta, arrepios, dor de cabeça, dor muscular, garganta inflamada, nariz entupido e tosse seca. Em alguns casos podem ainda verificar-se complicações, resultantes da progressão da infecção, que acontecem maioritariamente em indivíduos mais suscetíveis, podendo ocorrer ao nível do aparelho respiratório, a nível neurológico, cardíaco, renal e hepático. (5, 6)

A transmissão do vírus pode ocorrer por contacto direto ou indireto, por microgotículas que se dispersam no ar, quando expelidas por indivíduos infetados através de tosse ou espirros ou através de superfícies contaminadas. A fácil disseminação do agente viral conjugada com o curto período de incubação, com o período de transmissibilidade e a variabilidade genética e antigénica, permitem que o vírus apresente a capacidade de provocar epidemias e ocasionalmente pandemias.(3, 6, 7)

O termo epidemia tem origem no grego clássico *epi* (sobre) + *demos* (povo), é utilizado quando num curto período de tempo, se regista um grande número de casos de uma doença. Estima-se que anualmente as epidemias causem 35 milhões de casos graves de gripe e 250-500 mil mortes mundialmente.(3, 5-7) Os vírus *Influenza* que estão atualmente associados às epidemias anuais são o vírus *Influenza A* dos subtipos A(H₃N₂), A(H₁N₁)pdm09 e vírus *Influenza B* (Figura 1). (2, 8)

As epidemias sazonais são distintas das pandemias não apenas na sua etiologia mas também no seu impacto na saúde pública e nas características evolutivas do vírus. As pandemias ocorrem com várias décadas de intervalo e o seu início não está associado a uma época específica do ano. Provocam infecções potencialmente graves e muitas vezes associadas a elevadas taxas de mortalidade, não apenas pela virulência do agente infeccioso mas também por a população estar exposta a um vírus contra o qual não apresenta imunidade (Tabela 1). (2, 9)

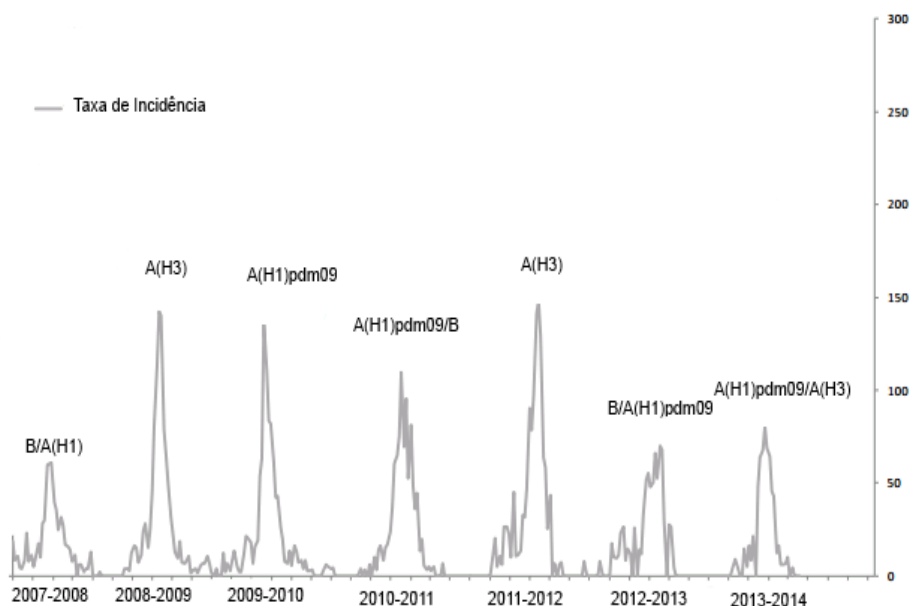


Figura 1 - Taxa de incidência da síndrome gripal por 100.000 habitantes e tipo de vírus Influenza predominante em cada época desde 2007 até 2014. (Adaptado de: Boletim de vigilância epidemiológica da gripe, época 2013-2014 disponível em <http://www.insa.pt>)

Tabela 1- Diferenças entre as epidemias sazonais e pandemias. Adaptado de Rebelo de Andrade *et al*, 2006

Epidemias Sazonais	Pandemias
Ocorre anualmente	Intervalos de várias décadas
Vírus <i>Influenza</i> A e/ou B	Vírus <i>Influenza</i> A
Sazonais	Em qualquer altura do ano
Infeção de gravidade variável (mais grave nos grupos de risco)	Infeção potencialmente mais grave associada a elevada morbilidade e mortalidade
Recuperação normalmente até 1 semana	A clínica depende da virulência da estirpe
Vacina previamente disponível	Vacina não disponível no início da pandemia
Vacina recomendada para grupos específicos da população	Vacina recomendada para toda a população

2. Vírus *Influenza*

2.1. Classificação e Nomenclatura

A classificação taxonómica em virologia depende dos critérios definidos pelo comité internacional de taxonomia viral (ICTV, do Inglês *International Committee on Taxonomy of Virus*). Os vírus são classificados de acordo com: a natureza do ácido nucleico; a simetria da cápside proteica; a presença ou ausência de invólucro lipídico; as dimensões do virião. (10)

Os vírus *Influenza* pertencem à família *Orthomyxoviridae* que é constituída por seis géneros: *Influenza A*; *Influenza B*; *Influenza C*; *Isavirus*; *Quaranjavirus* e *Thogotovirus*. Têm como característica comum um genoma de RNA de cadeia simples, segmentado, de sentido negativo (-ssRNA). O número de segmentos do genoma viral é variável com o género. Os viriões do género *Influenza* apresentam uma cápside de simetria helicoidal, e invólucro lipídico de dupla camada, com origem na célula hospedeira. O diâmetro das partículas virais é variável de 80 a 120 nm. (6, 11, 12)

Os géneros *Influenza A*, *Influenza B* e *Influenza C*, classificam-se de acordo com as propriedades antigénicas da nucleoproteína (NP) e da proteína da matriz (M1). Apenas os vírus *Influenza A* são classificados em subtipos virais, que são definidos de acordo com as propriedades antigénicas das glicoproteínas de superfície a hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) (18 HA e 11 NA descritas até ao momento). De entre estas apenas foram identificadas H1, H2, H3, H5, H7, H9 e N1, N2 no Homem. No entanto a transmissão eficiente no Homem apenas é observável em H1, H2 e H3. (2, 5, 8, 9, 13-15)

Com o intuito de uniformizar a designação dos diferentes tipos e subtipos virais a Organização Mundial de Saúde (OMS), definiu a seguinte nomenclatura, para os vírus *Influenza*: identifica-se o género, a localização geográfica do isolamento, seguido do número de ordem do laboratório e por fim o ano de isolamento. Quando o isolamento é feito a partir de animais, deve ser indicada a espécie depois do género *Influenza* em estudo. Quando nos referimos ao tipo A deve ser referenciado o subtipo de hemaglutinina e neuraminidase dentro de parêntesis (exemplo: A/Portugal/50/2012 (H₃N₂)). (5, 6)

2.2. Diferenças Entre Géneros *Influenza*

Os vírus *Influenza A*, *B* e *C* diferem na patogenicidade, na organização genómica, na variabilidade das glicoproteínas e nos hospedeiros que infetam (Tabela 2). (5, 6, 14)

Influenza A são os que mais preocupam os especialistas, uma vez que apresentam maior mutabilidade, capacidade evolutiva, virulência e podem provocar doenças potencialmente mais graves, quando comparados com os vírus *Influenza* do tipo B. O género *Influenza C* é, de entre os três géneros, o que regista menor número de infeções e de menor gravidade na espécie humana. (5, 6, 8, 11-14)

Tabela 2 - Diferenças entre os géneros *Influenza A*, *B* e *C*.

	<i>Influenza A</i>	<i>Influenza B</i>	<i>Influenza C</i>
Genoma	8 Segmentos	8 Segmentos	7 Segmentos
Glicoproteínas de superfície	HA NA	HA NA	HEF (hemaglutinina-esterase- fusão)
Hospedeiros	Homem Aves Suínos Outros mamíferos	Homem	Homem Canídeos Suínos
Taxa de mutação	Elevada	Menor que em A	-----
Doença	Potencialmente mais grave	Menos grave que o tipo A	Menor gravidade, por vezes assintomática
	Epidemias Sazonais Pandemias	Epidemias sazonais	-----

2.3. Morfologia e Estrutura de *Influenza A*

Os viriões de *Influenza A* são estruturas complexas, compostas por 70% de proteínas, 20% lípidos, 5 a 8% de carboidratos e 1 % de RNA. Morfologicamente as partículas recém-isoladas são pleomórficas, podendo apresentar-se sob a forma filamentosa. Estirpes isoladas em cultura celular ou cultura em ovos embrionados de galinha apresentam maioritariamente a forma esférica. (16)

O núcleo viral é constituído pelo complexo ribonucleoproteico (RNP), composto por segmentos de RNA, pela nucleoproteína (NP) e pelo complexo da polimerase (constituído pela polimerase ácida (PA), e duas polimerases básicas (PB1 e PB2)). O genoma está organizado em 8 segmentos de (-)ssRNA, cada segmento está associado a um RNP (Figura 2). (6, 7, 12, 14, 17-20)

As ribonucleoproteínas (RNPs) estão envolvidas numa matriz proteica, constituída pela proteína da matriz (M1). (8, 14) A matriz proteica encontra-se envolvida pelo involucro lipídico de dupla camada, de onde emergem as glicoproteínas de superfície (HA e NA) e a proteína integral de membrana em forma de canal iónico (M2), conferindo uma forma espiculada ao virião (Figura 3). (6, 7, 12, 14, 17-20)

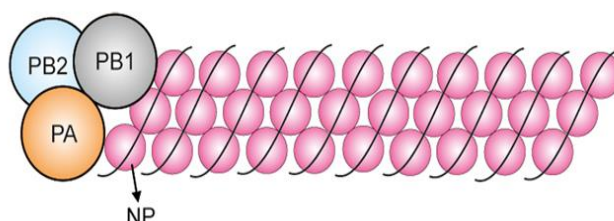


Figura 2- Estrutura do Complexo Ribonucleoproteico. Fonte: Schrauwen, 2014

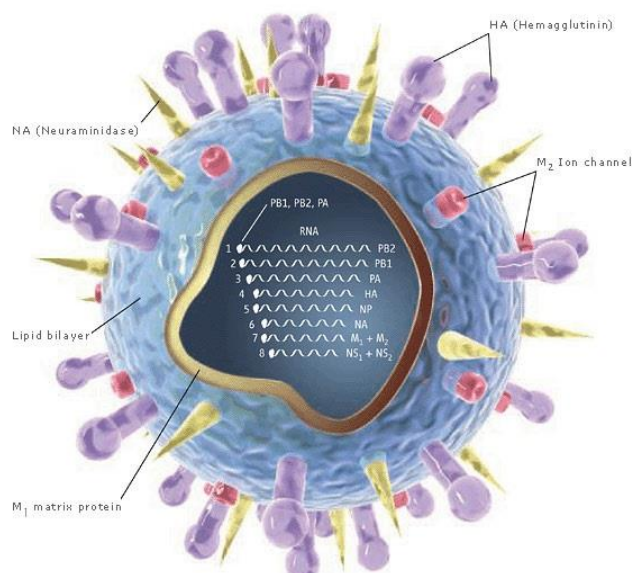


Illustration: Chris Bickel/Science. Reprinted with permission from Science Vol. 312, page 380 (21 April 2006) © 2006 by AAAS

Figura 3- Estrutura do virião de *Influenza A*. Fonte: IFMPA, disponível em <http://www.ifmpa.org/resources/influenza-vaccines/the-influenza-virus/the-influenza-virus.html> a 20/9/2014

2.4. Organização Genômica

Os segmentos genômicos de *Influenza A* são, por convenção, ordenados por tamanho decrescente, não sendo até ao momento descrita a sua organização no virião. O genoma viral é constituído por uma região codificante que apresenta em cada extremidade (5' e 3') uma região não codificante conservada em todos os segmentos. Os 8 segmentos de (-)ssRNA codificam pelo menos 12 proteínas (Figura 4). (6, 7, 21)

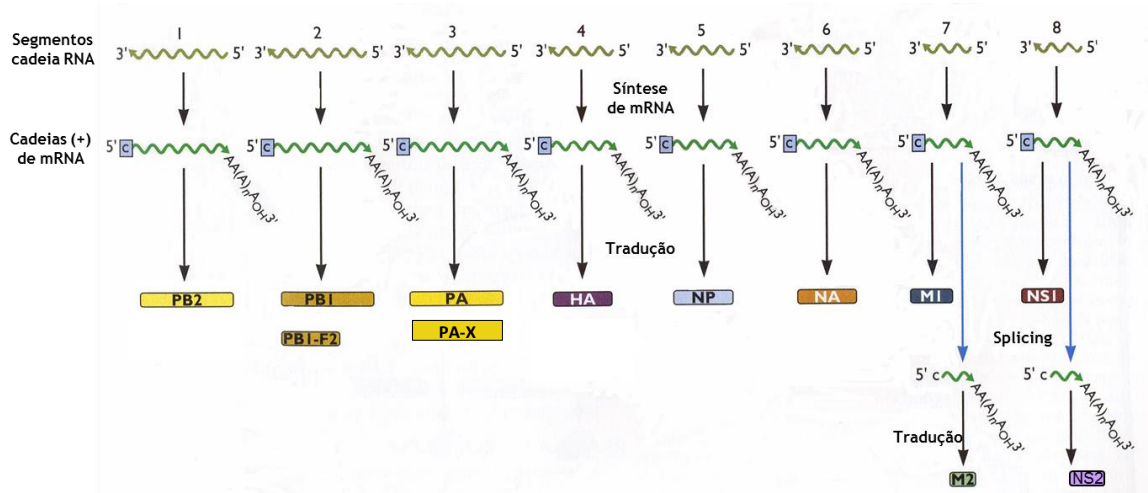


Figura 4- Organização genômica dos vírus Influenza A. Adaptado de Flint, 2004

Os três primeiros segmentos codificam as polimerases (PB2, PB1, PA) que formam o complexo polimerase, essencial no processo de transcrição e replicação viral. (12)

O primeiro segmento viral codifica a proteína PB2 que funcionalmente está não só associada ao complexo polimerase como também desempenha um papel importante na fase inicial da transcrição de mRNA viral. PB2 é descrita como responsável pelo reconhecimento e ligação à estrutura *cap* de mRNA da célula hospedeira para que este desempenhe a função de *primer* para a transcrição do RNA viral. Esta proteína (PB2) está ainda muitas vezes associada à adaptação da replicação de vírus aviários para a replicação num hospedeiro mamífero. (7, 16, 19)

O segundo segmento codifica para a proteína PB1. Esta proteína catalisa a adição sequencial de nucleótidos durante o processo de síntese da cadeia de RNA e apresenta regiões conservadas características da RNA-polimerase/RNA-dependente. PB1 desempenha funções nas ligações das extremidades do RNA viral (vRNA) e RNA complementar (cRNA) no início da transcrição e replicação, respetivamente. Funcionalmente apresenta ainda atividade de

endonuclease. A interação com a extremidade 3' do vRNA, gera um *primer* com *cap* essencial na síntese de mRNA. (6, 12)

O segundo segmento pode ainda codificar a proteína PB1-F2 com expressão interdependente com PB1. (22) PB1-F2 é codificada por uma fase de leitura aberta sobreposta na fase final 5' do gene PB1. PB1-F2 contribui para a patogenicidade dos vírus *Influenza A*, uma vez que está associada à indução da apoptose das células infectadas. Apenas alguns *Influenza A* expressam esta proteína. (7, 15, 23)

O terceiro segmento do genoma viral codifica para a polimerase ácida (PA) que apresenta atividade proteolítica. Sabe-se ainda que PA afeta a transcrição e a replicação viral. (6, 24) Este segmento codifica ainda para PA-X. PA-X é produto de um quadro de leitura alternativo de PA. Resulta de *frameshifting* ribossomal que compreende o domínio do terminal N de PA e um domínio C-terminal curto. A proteína PA-X está funcionalmente associada à modulação da resposta do hospedeiro. (15, 25)

Codificada pelo quarto segmento, a HA é a maior glicoproteína de superfície. Esta proteína funciona como antígeno viral, é responsável pela ligação do virião aos receptores de ácido siálico das células hospedeiras no início do processo de infecção. Esta proteína, é inicialmente sintetizada como precursor (HA₀). Após clivagem proteolítica, no processamento pós-tradução, esta proteína divide-se em duas subunidades (HA1 e HA2), inicialmente unidas por ligações de dissulfureto. (6, 8)

A nucleoproteína (NP) é codificada pelo quinto segmento. Esta é o principal constituinte do complexo ribonucleoproteico (RNP) e desempenha um papel importante na estrutura e formação da nucleocápside. Esta proteína é o principal alvo da reação cruzada dos linfócitos T citotóxicos em resposta à infecção viral. Funcionalmente esta proteína encontra-se ainda associada ao processo de transcrição e replicação do vRNA. (6, 7, 17, 26)

O sexto segmento do genoma viral codifica para a NA, a segunda glicoproteína de superfície mais abundante, do vírus *Influenza A*. A principal função de NA é a clivagem dos recetores de ácido siálico das células infectadas, o que permite não só a infecção de outras células pelos novos vírus recém-formados, como também previne a agregação dos viriões. A NA pode ainda estar associada ao início do processo infeccioso, podendo facilitar a entrada do vírus nas células. (12, 27, 28)

O sétimo segmento de vRNA produz até 4 mRNA, dos quais mRNA1 e mRNA2 codificam para proteína da matriz M1 e a proteína de membrana M2, respetivamente. Para mRNA3

continua por descobrir alguma proteína associada, ao passo que para mRNA4 foi recentemente identificada a proteína M42.(29)

M1 é a proteína mais abundante do virião. Forma uma ponte entre os componentes do interior do virião e as proteínas de membrana. Esta proteína é responsável pela exportação nuclear das RNPs virais. Desempenha um papel fundamental na estruturação e na libertação dos vírus recém-sintetizados.(6, 30, 31) A M2 é uma proteína abundante na membrana plasmática das células infetadas, no entanto é expressa em pequenas quantidades no virião. Esta proteína forma canais iónicos no invólucro. Pensa-se que a M2 é fundamental na replicação viral, uma vez que está funcionalmente associada à regulação do pH e à eliminação do revestimento das RNPs virais dentro da célula infetada.(12, 27, 30, 32) Estudos desenvolvidos mostram a complementaridade funcional de M2 e M42 *in vivo* e *in vitro*, desempenhando funções na replicação e na patogenicidade viral. (21, 29)

O menor segmento do genoma viral codifica para 2 proteínas: a proteína não estrutural NS1, anti interferão, e a proteína de exportação nuclear (NEP) também designada por NS2. NS1 não está presente no virião, no entanto é expressa nas células hospedeiras. Esta proteína está associada a múltiplas funções no processo infeccioso, tais como a replicação do vRNA, síntese proteica e a inibição da resposta imune do hospedeiro, muitas vezes designada como antagonista do interferão (INF). A NS2 por sua vez está funcionalmente associada ao direcionamento da exportação nuclear das RNPs virais para o citoplasma. (12, 21)

2.4.1. Organização genómica: estudos *in vitro*

Recentemente, diversos estudos com o intuito de caracterizar o genoma viral descrevem novas proteínas adicionais, expressas pelos vírus *Influenza A*, *in vitro*. No entanto, na sua maioria ainda não têm função descrita.

Atualmente, o segundo segmento codifica para mais uma proteína, para além das descritas anteriormente, a proteína PB1-N40. Esta proteína é codificada por uma variante truncada no terminal N do gene da PB1. Esta proteína não tem até ao momento função definida, sabendo-se que não é essencial para a replicação do vírus em cultura celular.(21, 22)

No terceiro segmento do genoma viral também foram encontradas duas proteínas até então desconhecidas, PA-N155 e PA-N182. PA-N155 e PA-N182 são proteínas que resultam de formas truncadas no terminal N de PA. Estas proteínas foram encontradas em vários

vírus *Influenza A* e pensa-se que podem desempenhar funções importantes no ciclo de replicação viral, no entanto ainda não há registo de uma função específica. (21, 33)

Há ainda registo de duas novas proteínas codificadas pelo oitavo segmento, a NS3 e NeG8 ou NSP. Ainda não existem função atribuída a estas proteínas, no entanto pensa-se que NS3 possa estar envolvida no processo de adaptação do vírus ao hospedeiro. (21)

2.5. Ciclo Replicativo

Os vírus são microrganismos intracelulares obrigatórios, totalmente dependentes de mecanismos celulares para se replicar. O ciclo de replicação do vírus *Influenza* é um processo relativamente rápido, podendo obter-se novas partículas virais após 8-10 horas do processo de infeção. No entanto este é um processo que implica diversas etapas, tais como: adsorção do vírus à célula hospedeira; descapsidação do complexo ribonucleoproteico viral e transporte para núcleo; transcrição, tradução e replicação do genoma viral; exportação das RNPs do núcleo e produção das proteínas; estruturação das partículas virais; gemulação e libertação de novos vírus (Figura 5). (19, 34, 35)

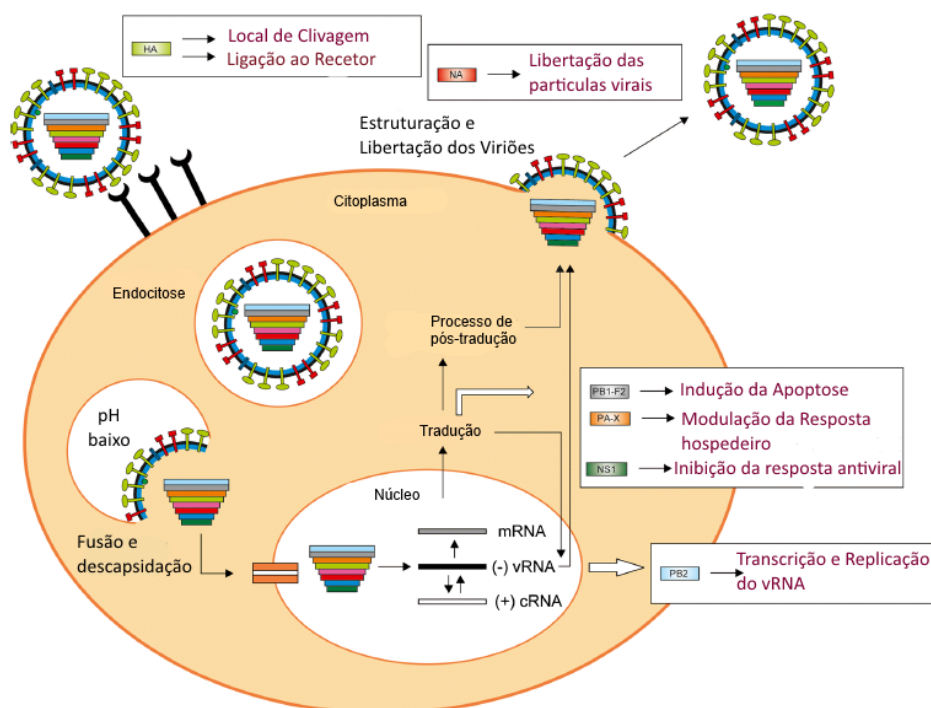


Figura 5- Ciclo replicativo dos vírus *Influenza A*. Fonte: Adaptado de Schrauwen, et al., 2014

2.5.1. Adsorção do Vírus à Célula Hospedeira

No início da infecção e replicação viral os vírus *Influenza* ligam-se aos receptores de ácido siálico presente na superfície das células, através da HA. Os vírus *Influenza A* podem infectar diversos hospedeiros e a interação dos diferentes subtipos com os recetores é limitada pela especificidade da HA. (36)

Os vírus *Influenza* que infectam o Homem ligam-se preferencialmente ao recetores de ácido siálico que têm o ácido N-acetilneuramínico ligado à penúltima galactose por meio da ligação α -2,6. Estes recetores encontram-se nas células epiteliais do trato respiratório superior. No entanto os vírus *Influenza* que infectam aves têm afinidade para a configuração α -2,3 que são encontrados nas células epiteliais do trato respiratório e do intestino das aves. (37, 38)

A adsorção do vírus à célula vai permitir a entrada do vírus na célula hospedeira por endocitose mediada por recetores. Após a formação de um endossoma os vírus passam pelo processo de descapsidação. (19, 36)

2.5.2. Descapsidação das Partículas Virais

Após a penetração do vírus na célula ocorre a descapsidação viral. Neste processo a acidificação do endossoma, até um $\text{pH} \approx 5$, é fundamental para mediar a fusão do invólucro viral com a membrana do endossoma e em simultâneo a libertação das RNPs no citoplasma. (12, 19, 36)

A acidificação provoca um rearranjo na cadeia proteica de HA o que leva à clivagem em duas subunidades, HA_1 e HA_2 . Após a exposição do péptido de fusão presente na extremidade N-terminal da subunidade HA_2 , ocorre a fusão das membranas do vírus e da célula. (36, 37, 39) A libertação das RNPs no citoplasma é promovida pela acidificação do endossoma que ativa os canais iónicos (M2), responsáveis pelo transporte dos protões para o interior do virião. Promovendo a descapsidação, através da destabilização da proteína M1 facilita a libertação das RNPs. (12, 19, 40)

Como a transcrição e replicação do genoma viral ocorre no núcleo das células infectadas, as RNPs são importadas para o núcleo através do poro nuclear. Este processo é mediado por sinais de localização nuclear mediados pelas NP. (40)

2.5.3. Transcrição do Genoma Viral

Após a entrada das RNPs no núcleo celular o vírus utiliza o mecanismo de transcrição da célula hospedeira para converter o vRNA em mRNA. Os vírus *Influenza* possuem o genoma de RNA segmentado de sentido negativo pelo que é essencial a presença da RNA polimerase no processo de transcrição. O complexo polimerase (PB1, PB2 e PA) presente nas RNPs permite que cada segmento sintetize o próprio mRNA. (19, 41)

A transcrição inicia-se aquando da interação do promotor do vRNA com a PB1. Seguidamente a PB2 reconhece e estabelece uma ligação com o *cap* 5' do mRNA celular, que funciona como *primer* na síntese de mRNA viral. Esta ligação com o *cap* estimula a função de endonuclease da PB1, que cliva o mRNA da célula hospedeira. A síntese do mRNA viral é catalisada pela PB1 até à extremidade terminal 5' do vRNA, onde encontra o sinal de poliadenilação. (12, 19)

Os mRNA sintetizados apresentam cadeia de sentido positivo e são cópias incompletas do vRNA que possuem uma terminação de poli(A) e um *cap* de mRNA celular. Os 8 mRNA são exportados do núcleo para o citoplasma através do poro nuclear, o transporte é mediado pelas proteínas M1 e NEP. (12, 35)

2.5.4. Tradução dos mRNA

No citoplasma os mRNA passam pelo processo de tradução. A tradução permite a expressão das proteínas. Os mRNA que codificam para PB2, PB1, PA, NP, NS1, NEP e M1 são traduzidos nos ribossomas citoplasmáticos, ao passo que os que codificam para M2, HA e NA são traduzidos pelos ribossomas associados ao retículo endoplasmático. (40, 41)

Após a tradução as proteínas PB1, PB2, PA e NP, são importadas para o núcleo, onde catalisam todo o processo de replicação. Também M1 e NS1 são transportadas para o núcleo. (41)

2.5.5.Replicação do Genoma Viral

A cadeia de vRNA não foi totalmente transcrita, pelo que uma parte será utilizada para a replicação do genoma viral. A replicação, que também ocorre no núcleo, consiste na síntese de cRNA, ou seja, uma cópia completa do vRNA mas de sentido positivo, desprovido de cap e de terminação poli(A). O cRNA serve de molde para a produção de vRNA de cadeia negativa que permite a produção de novos vírus. (12, 31, 36)

2.5.6.Estruturação e Libertação dos Viriões

Após a tradução e replicação do genoma viral as proteínas virais vão formar as RNPs no núcleo da célula hospedeira. As RNPs são exportadas do núcleo para o citoplasma pelo poro nuclear, processo mediado pela M1 e pela NEP. As proteínas M1 vão criar ligações com as RNPs que por sua vez vão induzir a paragem da transcrição de novos mRNA virais. (12, 35, 40)

As proteínas HA, NA e M2 são transportadas para a superfície celular e incorporadas na membrana plasmática, levando à formação do invólucro lipídico. Também os complexos ribonucleoproteico associados a M1 são transportadas para a superfície celular que contém as proteínas virais de superfície.(12, 41)

A interação dos componentes do interior do virião e as proteínas de membrana conduzem à formação da gémula no local de estruturação da partícula viral. A NA desempenha um papel fundamental na libertação dos viriões, uma vez que é responsável pela clivagem dos resíduos de ácido siálico na superfície da célula infetada, antes da incorporação (*budding*) dos componentes virais pela membrana plasmática. A membrana celular fecha-se formando o involucro lipídico do vírus e os viriões são libertados.(42)

O mecanismo responsável pela escolha e associação dos 8 RNP que compõe os viriões de *Influenza* permanece desconhecido. (40)

2.6. Evolução dos vírus *Influenza A*

Os vírus *influenza A* estão associados a uma elevada capacidade evolutiva. Todos os segmentos sofrem alterações ao longo do tempo, sendo estas mais evidentes e frequentes nos segmentos que codificam para as glicoproteínas de superfície, uma vez que é sobre estas que o sistema imunitário do hospedeiro atua na tentativa de neutralizar o vírus. Podem destacar-

se as variações antigénicas *major* (*shift*) e antigénicas *minor* (*drift*) como principais responsáveis por estas alterações (Figura 6). (42-44)

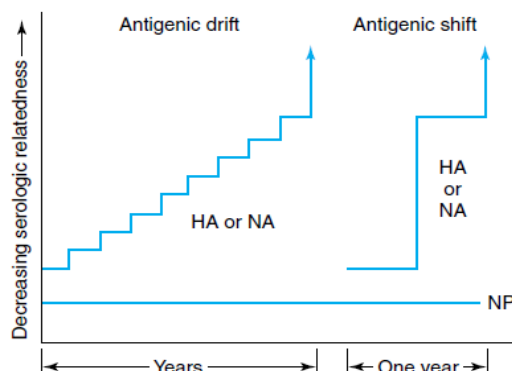


Figura 6- As alterações antigénicas *Major* (*Shift*) podem levar ao aparecimento de um novo subtipo viral, no entanto as alterações antigénicas *Minor* (*Drift*) são o principal responsável pelas alterações graduais, dos vírus influenza. As alterações nas glicoproteínas de membrana são mais frequentes. Fonte: Levison, 2012

As variações antigénicas *major* (*ou Shift*) estão apenas associadas aos vírus *Influenza A*. É um mecanismo que ocorre com pouca frequência, no entanto, está normalmente associado ao aparecimento de pandemias, uma vez que pode implicar o aparecimento de um novo subtipo viral para o qual o Homem não tem imunidade. Os diferentes subtipos de *Influenza A* apresentam diferenças epidemiológicas, de patogenicidade e de virulência (Tabela 3). (42, 43) As variações antigénicas *major* ocorrem principalmente por dois mecanismos (Figura 7):

- *Rearranjo de segmentos genómicos*

Quando vírus influenza que infetam espécies distintas co-infetam um único hospedeiro, que vai funcionar como reservatório de recombinação e onde vai ocorrer a troca de segmentos genómicos entre os vírus infetantes. Nestas trocas de segmentos genómicos pode surgir um vírus novo com glicoproteínas de superfície para o qual a população não apresenta imunidade. (2)

- *Mutação adaptativa*

Quando um vírus aviário adquire mutações graduais, durante as infeções sequenciais no homem ou noutros mamíferos, envolvendo a alteração da especificidade dos recetores virais que adquirem a capacidade de se ligar preferencialmente às células do trato respiratório humano, em detrimento da ligação às células aviárias. (2, 8)

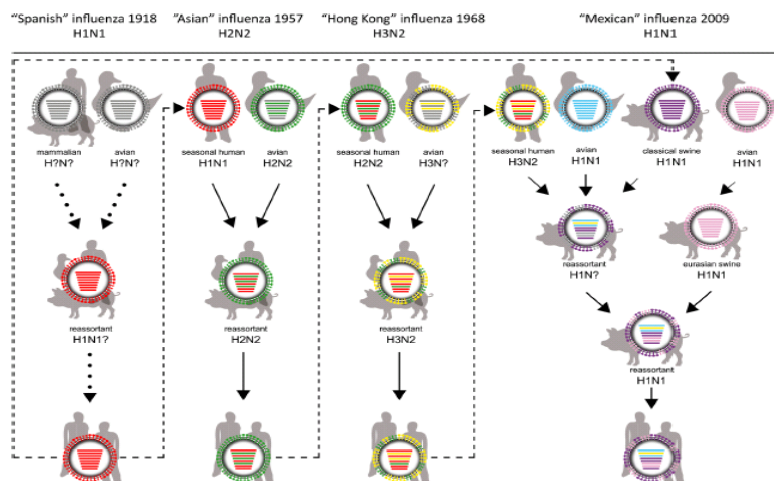


Figura 7- Mecanismos associados às alterações antigénicas *major*, responsáveis pelas pandemias de gripe. A pandemia de “Gripe espanhola” (1918) pode ter ocorrido por rearranjo dos segmentos genómicos ou por mutação adaptativa, existindo evidências de ambos. Até 1957 o vírus do subtipo A(H₁N₁) foi responsável pelas epidemias de gripe sazonal. O rearranjo dos segmentos genómicos do subtipo viral A(H₁N₁) com um subtipo de origem aviária A(H₂N₂) deu origem à pandemia de “Gripe asiática”. Este novo subtipo, que apresenta os genes HA, NA e PB1 de origem aviária, circulou até 1968. Emergência de A(H₃N₂), resultante de um novo rearranjo de segmentos genómicos de um vírus de origem aviária com a estirpe circulante. Este novo subtipo adquiriu os genes HA e PB1 da estirpe de origem aviária dando origem à pandemia de “Gripe de Hong Kong”. Em 2009 surgiu a primeira pandemia de gripe do século XXI, provocada por um subtipo de vírus influenza distinto dos pré-existentes, A(H₁N₁)pdm09. O vírus responsável pela “Gripe Mexicana” adquiriu os genes que codificam para a NA e M de um A(H₁N₁) com origem em suínos, os outros genes resultaram de um triplo rearranjo entre a estirpe sazonal em circulação do subtipo A(H₃N₂), uma estirpe de origem aviária do subtipo A(H₁N₁) e uma estirpe de origem suína muito semelhante à do subtipo A(H₁N₁) responsável pela pandemia de 1918. **Fonte: Schrauwen, 2014**

Tabela 3-Pandemias de Gripe. Adaptado de: George, 2014

Pandemias	Subtipo	Mortalidade específica	Grupos mais atingidos em Portugal
1918-1919 Gripe Pneumónica	A(H ₁ N ₁)	20-50 Milhões de óbitos	Jovens adultos 60 - 100 Mil óbitos
1957-1958 Gripe Asiática	A(H ₂ N ₂)	1-4 Milhões de óbitos	Todas as idades 1050 Óbitos
1968-1969 Gripe de Hong Kong	A(H ₃ N ₂)	1-4 Milhões de óbitos	Todas as idades Sem registos de mortalidade
2009-2010 Gripe Mexicana	A(H ₁ N ₁)pdm09	100-400 Mil óbitos	Crianças e jovens adultos 124 Óbitos

As variações antigénicas *minor* resultam da acumulação de mutações pontuais no genoma viral. A elevada frequência deste processo está relacionada com a inexistência de *proofreading* na RNA-polimerase RNA-dependente durante a replicação do RNA viral, o que contribui com um erro de replicação na ordem de 1 em 10^4 bases. Este tipo de mutação permite que o mesmo subtipo viral possa circular na população, por anos consecutivos, uma vez que conseguem escapar à pressão imunológica da população. Estas alterações genómicas permitem a evolução constante dos vírus influenza e estão relacionadas com as epidemias anuais de gripe. (8, 9, 42, 45)

3. Resposta Imune à Infecção por Vírus *Influenza A*

A infecção das células epiteliais do trato respiratório por vírus *Influenza A* estimula a *resposta imune inata* e a *resposta imune adquirida*. Os mecanismos envolvidos na *resposta imune inata* atuam imediatamente após o contato do hospedeiro com os antígenos virais, permitindo controlar a replicação viral numa fase inicial da infecção. Por outro lado, os mecanismos envolvidos na *resposta imune adquirida* desenvolvem-se sequencialmente e de forma mais lenta e sincronizada, resultando na indução de células e moléculas executoras, que permitem a eliminação do vírus, induzindo a morte celular (Figura 8). (46-48)

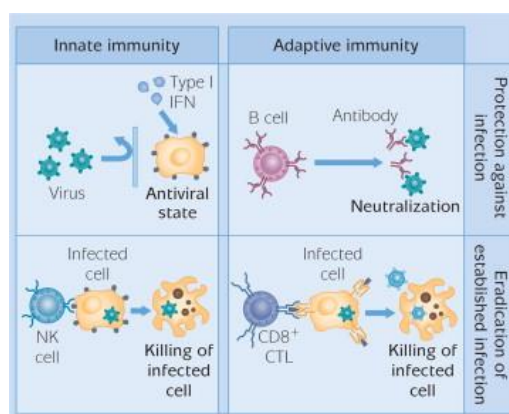


Figura 8- Resposta celular à infecção por vírus *Influenza A*. Fonte: Wilschut et al, 2006

3.1. Resposta Imune Inata

A *resposta imune inata* desencadeia-se após o reconhecimento dos antígenos virais pelos *receptores Toll-like* (TLR). Leva à produção de interferões do tipo I (INF-I) (como INF- α e INF- β) e de outras citocinas pró-inflamatórias, assim como à morte de células infectadas pela ativação das células *Natural Killer* (NK). (46, 47, 49)

Os INF-I têm uma forte atividade antiviral, quando libertados no meio extracelular, interagem com as células vizinhas e inibem a síntese proteica nas células hospedeiras, o que implica a inibição da replicação do vírus. A ativação e recrutamento das células NK, macrófagos, células T (também designadas por linfócitos T) é outra das funções desempenhadas pelos INF-I na resposta antiviral, levando à morte celular. Os INF-I estabelecem ainda uma ligação com a *resposta imune adaptativa*, uma vez que contribuem para a maturação das células apresentadoras de antígeno (APC), aumentando a expressão dos complexos de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II e consequentemente a maior apresentação de antígenos às células T. (47, 49)

Outro dos principais elementos da *resposta imune inata* à infeção viral são as células NK. Estas células quando estimuladas libertam perforina no meio extracelular. A perforina tem como principal função a facilitar a entrada da granzima A e B, através da formação de poros transmembranares nas células alvo. A granzima B, ao clivar proteínas nos resíduos de aspartato, pode ativar a via intrínseca da apoptose. (47, 49)

3.2. Resposta Imune Adaptativa

A *resposta imune adaptativa* ativa-se aquando da apresentação dos péptidos derivados das proteínas virais às células T pelas células apresentadoras de antígenos (células dendríticas, normalmente). As células T estão diferenciadas em dois tipos, as células T *helper* (CD4+), que tem como função produzir citocinas que vão contribuir para a proliferação e diferenciação de células B e a proliferação de linfócitos T citotóxicos (CTL). Uma das principais características da *resposta imune adaptativa* é a capacidade de desenvolver memória imunológica. Aquando de uma posterior exposição ao antígeno, a presença de memória imunológica permite uma resposta específica ao antígeno de forma mais rápida. (47)

Os anticorpos específicos contra as estirpes de vírus *Influenza A* são produzidos pelas células B, durante a *resposta imune adaptativa*, tendo como alvo principal as glicoproteínas de

superfície (HA e NA). A ligação do antígeno-anticorpo, facilita a fagocitose de partículas virais e a ação das células NK. (6, 47, 49)

Os linfócitos T citotóxicos (CD8+) possuem grânulos citoplasmáticos nos quais estão armazenadas as proteínas citotóxicas (granzima A e B, principalmente). Os CTL estão divididos em duas subpopulações (Tc1 e Tc2), baseado na secreção de citocinas. A produção de perforina ou do recetor de morte Fas, por ambas as subpopulações, têm como objetivo eliminação do vírus *Influenza A* através da morte das células infectadas. (6, 47, 49)

O mecanismo utilizado pelos linfócitos T é semelhante ao descrito para as células NK, a ativação da via intrínseca da apoptose pela via de sinalização da perforina/granzima. Ao passo que a produção do recetor Fas e a sua interação com o ligando vai ativar a via extrínseca da apoptose. (47, 49, 50)

4. Morte Celular

Os mecanismos fisiológicos de morte celular são essenciais na manutenção da homeostasia dos tecidos e organismos multicelulares ao longo da vida. Os processos de morte celular funcionam como mecanismo de defesa em resposta a estímulos intracelulares e extracelulares. (50, 51) Nos últimos anos muitos estudos têm tentado desvendar as vias de indução de morte celular, que na sua maioria ocorrem de forma programada. Vários são os processos de morte celular descritos (autofagia, morte celular mitótica, senescência, necrose, apoptose, entre outros). No entanto a remoção de células infectadas, dos organismos multicelulares, está normalmente associada aos processos de necrose e/ou apoptose. A necrose e apoptose são mecanismos distintos ao nível morfológico (Figura 9), no entanto é frequente a ocorrência de ambos os processos em simultâneo na mesma célula. A partilha de vias bioquímicas pode converter um processo apoptótico em curso, num processo necrótico dependendo de alguns fatores tais como a diminuição na disponibilidade de *cystein aspartic acid-specific proteases* (caspases) ou de ATP intracelular. (51-54)

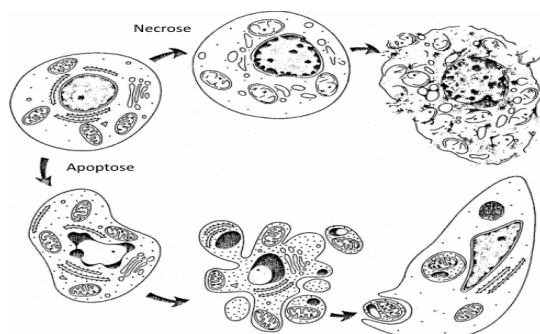


Figura 9- Diferenças morfológicas entre Necrose e Apoptose. Adaptado de: Kerr et al, 1962

4.1. Necrose

A necrose pode ocorrer em consequência de agressões patológicas ou fisiológicas (infecção ou inflamação), assim como por variações extremas das suas condições (hipotermia ou hipoxia). As alterações na homeostasia celular podem provocar rutura da membrana celular e lise total da célula com subsequente libertação dos componentes citoplasmáticos para o exterior, desencadeando quase sempre resposta inflamatória dos tecidos envolventes. Bioquimicamente, este é um processo que não requer energia. (48, 50, 53-56)

4.2. Apoptose

A apoptose pode ser desencadeada em resposta a diferentes estímulos, sendo esta a via de morte celular melhor caracterizada, principalmente em infeções virais. Pode ser identificada pela morfologia celular, pela ausência de resposta inflamatória, assim como pelas vias bioquímicas ativadas. (48, 50, 53-56)

Neste processo de morte celular existe um período de latência entre a exposição aos estímulos/fatores que induzem a apoptose e as alterações morfológicas. Este período é variável e dependente do tipo de célula, das condições do meio, da intensidade de exposição assim como da duração do estímulo. (57)

Inicialmente, as células que se encontram no processo apoptótico apresentam arredondamento e redução do volume celular, que leva à perda da aderência com a matriz celular e com as células adjacentes. As alterações morfológicas características da apoptose são a condensação do núcleo e da cromatina, a fragmentação do núcleo e a formação de corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são pequenas estruturas vinculadas por membranas que contêm os componentes citoplasmáticos e que se formam em consequência de prolongamentos da membrana celular. (53, 54)

A fragmentação da célula em corpos apoptóticos permite a rápida e eficiente remoção por macrófagos ou pelas células vizinhas, sem desencadear resposta inflamatória. Estas transformações morfológicas são reflexo de uma sucessão de alterações bioquímicas. (48, 54, 58)

Bioquimicamente, o mecanismo de apoptose envolve duas vias de sinalização, que convergem mutuamente e através da cascata proteolítica de caspases. As caspases são proteases da família das cisteínas e têm a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato. Estas proteases são classificadas de acordo com o seu pró-

domínio e o seu papel neste mecanismo de morte celular. Caspases iniciadoras (caspase-2, -8, -9 e -10) possuem pró-domínios longos e são autocatalíticas, estando envolvidas na iniciação da cascata proteolítica. Caspases executoras (caspase-3, -6 e -7) podem não apresentar pró-domínios ou quando estão presentes são curtos, têm a função de clivar substratos. Essa clivagem permite a correlação com as alterações morfológicas. (53, 54, 59)

As duas principais vias de ativação da apoptose são classificadas, em intrínsecas e extrínsecas (Figura 10), no entanto foram descritas outras vias capazes de ativar a apoptose em células de mamífero. Sendo exemplo disso as células T-citotóxicas e as células *natural killer* (Nk) que desencadeiam a apoptose em células-alvo suscetíveis, através das proteínas perforina/granzima B. (50, 54, 60)

4.2.1. Via Apoptótica Intrínseca

A via intrínseca ou mitocondrial de apoptose é induzida por estímulos com origem intracelular, podem destacar-se: perda de adesão ao substrato, falta de fatores de crescimento, inibição da síntese de macromoléculas, *stress* no retículo endoplasmático ou alterações no genoma ou no citoesqueleto celular. Estes estímulos provocam a ativação de moléculas pró-apoptóticas, cuja ação converge ao nível da mitocôndria. As moléculas pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik e Blk) e anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-xL, Bcl-XS, Bcl-w e BAG) responsáveis pela regulação intracelular da apoptose pertencem à família Bcl-2. (54, 61, 62)

A razão entre ambos os membros desta classe reguladora da apoptose levam à alteração do potencial da membrana mitocondrial e possibilita a formação de canais proteicos na membrana externa permitindo a libertação seletiva do citocromo c e de outros polipéptidos para o citoplasma. (54, 61, 62)

Após a libertação do citocromo c para o citoplasma, este liga-se à proteína citoplasmática adaptadora, a *Apoptotic protease activating factor 1* (Apaf-1), a qual vai recrutar e ativar a prócaspase-9, constituindo um complexo proteico denominado de apoptossoma. Subsequentemente o apoptossoma, cliva e ativa a caspase-9, que inicia a cascata proteolítica, ou seja, leva à ativação das caspases executoras. (53, 54, 61)

Uma vez ativadas, as caspases executoras clivam variados substratos celulares, que resultam nas alterações morfológicas observadas em células em apoptose. (54)

4.2.2. Via Apoptótica Extrínseca

A via apoptótica extrínseca, também denominada de via dos recetores de morte, é induzida pela interação dos recetores de morte existentes na superfície da célula com os seus ligandos específicos. Os recetores de morte e os ligandos são proteínas transmembranares. De acordo com Elmore (2007) os ligandos melhor caracterizados e os respetivos recetores são: FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 e Apo2L/DR5. (54)

Após a ligação dos ligandos, os recetores sofrem alterações conformacionais, que levam ao recrutamento de proteínas adaptadoras, presentes no citoplasma, tais como a *Fas associated death domain* (FADD) ou *tumor associated death domain* (TRADD). Estas proteínas adaptadoras em interação com as caspases-8 ou -10 vão formar um complexo que vai sinalizar a indução da morte, este denomina-se por *death-inducing signaling complex* (DISC). Este complexo DISC permite a ativação das caspases iniciadoras, desencadeando a cascata de caspases, resultando nas alterações morfológicas, tal como referido na via intrínseca. (54, 57)

As caspases-8 e -10 podem ainda ser responsáveis pela convergência da via intrínseca e extrínseca. Uma vez que, alternativamente estas duas caspases podem clivar a molécula pró-apoptótica Bid. A forma truncada de Bid desencadeia alterações conformacionais noutras proteínas pró-apoptóticas (Bax e Bak), essenciais na formação de canais na membrana mitocondrial externa, alterando o potencial de membrana e consequente libertação do citocromo c no citoplasma. A convergência de ambas as vias de indução da apoptose, pode servir para iniciar e/ou amplificar os sinais intracelulares da apoptose. (50, 57, 58, 62)

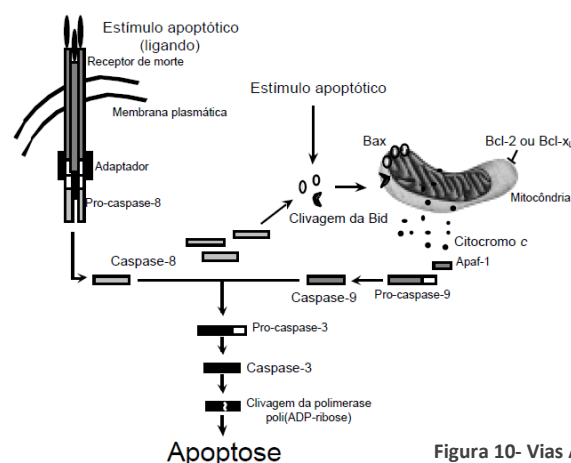


Figura 10- Vias Apoptóticas. Fonte: Solá, S. (2001)

5. *Influenza A* e Apoptose

Os vírus *Influenza A* induzem a apoptose *in vivo* e *in vitro*. (48) Estes possuem constituintes virais (NS1, PB1-F2), que permitem evadir a resposta imune do hospedeiro. O facto de várias proteínas virais desempenharem funções anti e/ou pró-apoptóticas pode ser um indicador de que o vírus evoluiu no sentido de equilibrar os processos apoptóticos durante a infeção. (48, 49, 63)

Diversos estudos sugerem que os vírus *Influenza A* têm a capacidade de inibir a morte celular na fase inicial da infeção e de induzir a apoptose numa fase mais tardia da infeção, de modo a promover uma replicação viral eficiente. (48, 64)

Na fase inicial do processo infeccioso a proteína NS1 desempenha atividade anti-apoptótica e está associada à ativação da via de sobrevivência celular *phosphatidylinositol-3-kinase*(PI3K)/Akt. A ativação desta via leva à inibição da cascata de caspases e consequentemente à inibição da apoptose. A NS1 tem a capacidade de inibir a indução do INF, com base na interação com os componentes que regulam a transcrição, processamento e tradução do mRNA. (7, 48, 63, 65-67)

A proteína PB1-F2 estimula a apoptose das células infetadas numa fase mais tardia da infeção. Esta proteína desempenha atividade pró-apoptótica e está associada à permeabilização e destabilização da membrana mitocondrial, levando à libertação do citocromo c e, consequentemente, à indução da apoptose pela via intrínseca e promovendo a libertação dos vírus recém-formados. A expressão de PB1-F2 é dependente de cada subtipo, podendo estar truncada em alguns subtipos virais, sendo o caso do A(H₁N₁)pdm09. (7, 48, 49, 63, 68)

À luz dos conhecimentos atuais a inibição/indução da apoptose é resultado do equilíbrio entre a defesa antiviral do hospedeiro e a sua interação com os componentes virais com funções anti e pró-apoptóticas. No entanto muito continua por descobrir na interação-vírus hospedeiro, sendo necessário a realização de estudos que permitam explorar esses mecanismos e que objetivem descobrir novos-alvos terapêuticos, de modo a aumentar a eficiência da resposta imune antiviral e inibir a replicação viral.

Objetivos

Objetivo Principal

Inúmeros estudos têm sido desenvolvidos para a caracterização dos vírus *Influenza*, sendo muitas vezes descritos mecanismos de interação vírus-hospedeiro. De entre esses estudos vários sugerem a relação entre o vírus *Influenza* e a indução/inibição da apoptose, podendo esta interação estar associada a alguns constituintes virais ou à resposta celular à infecção.

Sabe-se que a epidemiologia dos vírus *Influenza* é diferente entre os diversos tipos e subtipos virais, pelo que se podem colocar as seguintes questões: os diferentes tipos e subtipos virais apresentam diferenças na cinética da apoptose? Como é que este mecanismo evolui durante a infecção viral?

Neste contexto, definiu-se como objetivo principal deste projeto, analisar quantitativamente a cinética da apoptose em infeções por vírus influenza do tipo A de diferentes subtipos (A(H₃N₂) e A(H₁N₁)pdm09).

Com o intuito de cumprir o objetivo principal deste estudo, foram estabelecidos objetivos específicos.

Objetivos específicos

- Avaliar e comparar a morte celular total em infeções por vírus *Influenza* do tipo A de diferentes subtipos (A(H₃N₂) e A(H₁N₁)pdm09);
- Avaliar e comparar a apoptose em infeções por vírus *Influenza* do tipo A de diferentes subtipos (A(H₃N₂) e A(H₁N₁)pdm09).

Material e Métodos

Durante a realização do trabalho experimental e com o intuito de cumprir os objetivos propostos, houve necessidade de recorrer a diferentes técnicas laboratoriais. No decurso do trabalho, foi estabelecida e mantida a cultura celular necessária a todo o estudo, foram constituídos *stocks* virais através do isolamento e propagação das diferentes estirpes de vírus influenza em cultura celular. (69) Para avaliar a cinética da morte celular total e da apoptose realizaram-se ensaios de citotoxicidade (medição da enzima lactato desidrogenase) e a coloração de Hoescht, respetivamente.

Todos os procedimentos foram executados numa câmara de segurança biológica de classe II.

1. Cultura Celular

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a linha celular *Mandin-Darby Canine Kidney* (MDCK) para a realização de ensaios com o vírus *Influenza*, no entanto, quando se utiliza uma linhagem destas células transfectada com o gene humano *CMP-Nacetylneuraminate beta-galactoside α -2,6-sialyltransferase* (SIAT1), obtêm-se melhores resultados uma vez que esta modificação genética confere às células a capacidade de sobreexpressar os recetores de ligação de ácido siálico na configuração α -2,6, recetores para os quais o vírus tem afinidade no trato respiratório humano. (69, 70)

Neste trabalho foi utilizada a linha celular MDCK-SIAT1 (ECACC, Public Health England, Salisbury, Reino Unido). Estas são células epiteliais de linha contínua, ou seja podem ser propagadas e mantidas em cultura por passagens sucessivas (normalmente o máximo de trinta passagens), sem perder as suas características. (71, 72)

A cultura de células de linha contínua é um processo que tem como objetivo, o crescimento e manutenção de uma linha celular sob condições controladas. O crescimento normal das células em cultura requer o manuseamento em ambiente estéril, o fornecimento de meio rico em nutrientes e estabilidade relativamente à temperatura e ao pH. (71, 72)

A linha celular MDCK-SIAT1 foi cultivada em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Media* (DMEM) suplementado, consistindo em meio DMEM simples de alta concentração de glucose (Gibco®, Life technologies), suplementado com L-glutamina (Gibco/Invitrogen), solução de aminoácidos não essenciais (NNEA) (Gibco®, Life technologies) e solução tampão de HEPES (Gibco®, Life technologies) de acordo com a Tabela 4.

MDCK-SIAT1 têm a necessidade de aderir a superfícies de contacto no processo de divisão (células aderentes). A adesão das células é mediada por proteínas transmembranares pertencentes às superfamílias caderinas (ligações célula-a-célula) e integrinas (ligações célula-matriz). (71-74) O material de cultura, para células aderentes, apresenta uma superfície polarizada negativamente. A carga negativa vai criar forças electroestáticas com catiões bivalentes (Ca^{+2} e Mg^{+2}) e estimular a produção de proteínas de adesão, o que permite a adesão da matriz extracelular à superfície de contacto. (71, 74)

Distinguem-se três fases no processo de cultura de células MDCK-SIAT1. A descongelação que tem como objetivo o retomar da linha celular crio-preservada a -196°C , em azoto líquido, em *meio de congelação* (DMEM suplementado, 20% Soro Fetal Bovino (FBS) (Gibco®, Life technologies) e 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma)). Segue-se a manutenção da cultura celular que permite não só remover as células inviáveis que resultam do processo de descongelação ou da passagem de células, assim como objetiva ainda privar as células da presença constante de FBS, visto que este componente inibe a propagação viral em cultura celular. A ausência de FBS no *meio de manutenção* e a diminuição da temperatura de incubação, reduz o metabolismo celular, o que permite diminuir o número de passagens das células. A passagem tem como objetivo prevenir a morte das células, através da renovação da cultura celular.

Tabela 4- Meios de cultura utilizados

Meios	Reagentes (Concentração final)	Fabricante
Suplementado	<i>Dulbecco's Modified Eagle Media</i> (DMEM)(1X)	Gibco®; Invitrogen™; Life technologies™
	L-Glutamina (0,522mM)	
	Aminoácidos não essenciais (NNEA) (1X)	
	HEPES (24mM)	
Congelação	Meio suplementado	
	Soro Fetal Bovino (FBS) (20%)	Gibco®; Invitrogen™; Life technologies™
	Dimetilsulfóxido (DMSO) (10%)	Sigma
Crescimento para Continuação da Linha Celular	Meio suplementado	
	Soro Fetal Bovino (FBS) (10%)	Gibco®; Invitrogen™; Life technologies™
	Geneticina G418 (1mg/ml)	

Meios	Reagente (Concentração final)	Fabricante
Manutenção	Meio suplementado	
	Geneticina G418 (1mg/ml)	Gibco®; Invitrogen™; Life technologies™
Crescimento para Infecção	Meio suplementado	
	10% FBS	Gibco®; Invitrogen™; Life technologies™
	Penicillin-Streptomycin-Neomycin (PSN)(1X)	
	Fungizona (2,5µg/ml)	
Cultura para Infecção	Meio suplementado	
Cultura para Infecção	Penicillin-Streptomycin-Neomycin (PSN) (1X)	Gibco®; Invitrogen™; Life technologies™
	Fungizona (2,5µg/ml)	Gibco®; Invitrogen™; Life technologies™
	HEPES (0,85mM) ¹	Gibco®; Invitrogen™; Life technologies™
	Trypsine TPCK treated (3µg/ml)	Worthington Biochemical Corporation

1- Adicional ao já presente no meio suplementado

1.1. Descongelação de Células

A descongelação de uma alíquota de células fez-se por imersão em banho quente (37°C). A suspensão celular descongelada foi transferida para 5ml de *meio suplementado*, seguido de centrifugação a 1200 rotações por minuto (rpm), durante 5 minutos. Removeu-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o precipitado em 7ml de *meio de crescimento para continuação da linha celular* (Tabela 4), previamente aquecido a 37°C e preparado no frasco de cultura para o qual a suspensão celular foi transferida.

A cultura celular foi mantida na estufa a 37°C. Observou-se diariamente a cultura celular, ao microscópio ótico de campo invertido, até obtenção de uma confluência de aproximadamente 90%. A linha celular estabelecida serviu exclusivamente para a realização deste estudo.

1.2. Manutenção da Cultura

Sempre que as células apresentam uma boa confluência e morfologia (confirmada por microscopia ótica), procedeu-se à substituição do *meio de crescimento para continuação da linha celular por meio de manutenção* (Tabela 4).

Realizaram-se duas lavagens com *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline* (DPBS) (Gibco®; Life technologies™), pré-aquecido a 37°C, entre a troca dos meios. A cultura foi mantida na estufa a 32°C.

A redução da temperatura assim como a privação de FBS permitem a diminuição do metabolismo celular, o que permite diminuir o número de passagens de células.

1.3. Passagem de Células

As células devem ser mantidas em manutenção até um período máximo de 5 dias, uma vez que o meio torna-se citotóxico. Desta forma realizou-se semanalmente a observação da cultura celular por microscopia ótica. Confirmada a confluência adequada e morfologia das células procede-se à sua propagação.

O procedimento iniciou-se com a remoção do *meio de manutenção*, seguido de duas lavagens com DPBS, pré-aquecido a 37°C. MDCK-SIAT1 são células aderentes, pelo que tem que se realizar a tripsinização, ou seja a dissociação enzimática das células por ação da tripsina.(71)

Adicionou-se 2 ou 3ml de tripsina-EDTA (Gibco®, Life technologies™), pré-aquecida a 37°C, nos frascos de 25cm² ou de 75cm², respetivamente, durante 1 a 2 minutos. Seguidamente retirou-se o excesso de tripsina e colocou-se a incubar na estufa a 37°C, até observação da dissociação total da monocamada de células.

Ressusponderam-se as células em 4,5 ou 9ml (frascos de 25 ou 75cm², respetivamente) de *meio suplementado*, pré-aquecido a 37°C e adicionou-se 0,5 ou 1 ml FBS (frascos de 25 ou 75cm², respetivamente), o que permite parar a ação da tripsina. (72, 75) Obteve-se 5 ml ou 10 ml de suspensão celular, de acordo com o frasco de cultura utilizado. Seguidamente fez-se a determinação da viabilidade celular, de modo a obter a concentração da suspensão celular obtida.

A passagem de células neste trabalho teve como finalidade manter a linha celular contínua ao longo dos ensaios assim como a preparação de culturas para infeção com vírus *Influenza*.

1.3.1. Determinação da viabilidade celular

Após a preparação da suspensão celular procedeu-se ao cálculo da respetiva concentração celular, pelo que se recorreu à coloração com azul tripano (Gibco®, Life technologies).

A coloração com azul de tripano é uma técnica de exclusão, ou seja, permite a diferenciação das células viáveis das inviáveis. Após a aplicação do corante, as células inviáveis ficam coradas de azul, ao passo que nas células viáveis a membrana se encontra intacta o que constitui uma barreira para a entrada do corante. (76)

Para a determinação da viabilidade celular recolheu-se 20 μ l de suspensão celular e diluiu-se em 20 μ l de azul de tripano 0,4%. Colocou-se o preparado na câmara de *Neubauer* seguida da observação ao microscópio ótico de campo invertido. (72)

A quando da observação ao microscópio, na câmara de *Neubauer* existem várias linhas perpendiculares com marcações em quadrantes, os quais são utilizados como grelha de contagem (Figura 11). Faz-se a contagem da totalidade das células viáveis (não coradas), observadas nos quatro quadrantes da câmara de *Neubauer* (A a D, Figura 11). Seguidamente calcula-se a média de células viáveis contadas.

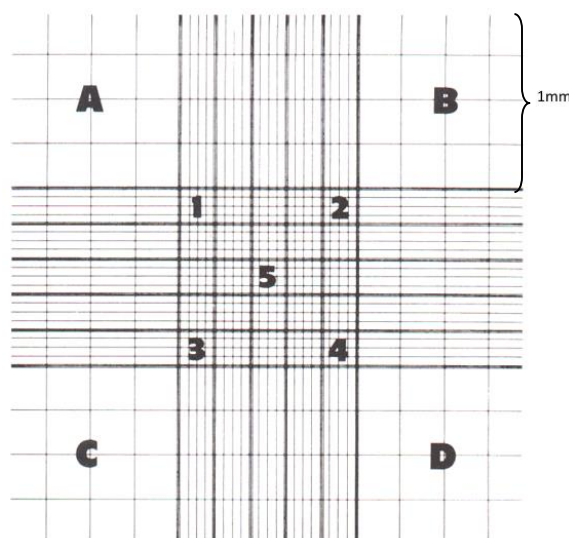


Figura 11- Quadrantes da câmara de Neubauer. Disponível em <http://medciclopedia.net/diccio/h/images/hemocitometro.jpg> a (1/09/2014)

A concentração celular calculou-se através da média das células viáveis, multiplicado pelo fator de diluição (2) e pelo volume de cada quadrante (Fator da câmara de *Neubauer*= 1×10^4 ml) (Figura 12).

$$\text{Concentração celular} = \text{média de células viáveis contadas} \times \text{fator de diluição}(2) \times 10^4$$

Figura 12- Fórmula da concentração da suspensão celular

1.4. Determinação da Concentração Celular

Após a determinação da viabilidade celular a suspensão pode ser propagada em diferentes recipientes de cultura (tubos, frascos ou placas, Tabela 5) de acordo com o procedimento a realizar.

Realizaram-se ensaios teste recorrendo a diferentes concentrações celulares (células/cm² ou células/ml), para padronizar a concentração a utilizar, em função da confluência adequada aos diversos procedimentos em diferentes intervalos de tempo.

Na passagem de células são preparados frascos de cultura (Tabela 5) com meio de crescimento para continuação da linha celular (Tabela 4) ao qual é adicionada a suspensão celular. Utilizou-se 3- 4x10⁴células/cm² na preparação dos frascos, com o objetivo de definir qual a concentração que permite obter uma confluência de 90% em 48 horas. Na preparação de culturas para infeção a suspensão celular é adicionada ao *meio de crescimento para infeção* (Tabela 4).

Aquando do isolamento e propagação das estirpes virais o laboratório tem definida a concentração de 30x10⁴células/ml para a preparação de cultura em tubo, uma vez que esta concentração permite observar ao fim de 24 horas uma confluência de 90%. Na preparação de frascos de cultura para infeção foram testadas as concentrações 3x10⁴ e 4x10⁴células/cm², com o intuito de observar uma confluência de 90% ao fim de 48 horas.

Nas culturas de células em placas (de Petri ou de 96 poços) testou-se as concentrações celulares desde 2x10⁴ a 8x10⁴células/cm², de forma a determinar qual a concentração de suspensão celular ideal para obter uma confluência de 80% em 24 horas e desta forma definir a concentração a utilizar no método de titulação das suspensões virais (TCID₅₀) e nos ensaios de citotoxicidade e coloração de Hoescht.

Tabela 5- Recipientes de cultura celular

Material de cultura (Fabricante# N° catálogo)	Área de cultivo	Volume de trabalho ¹
Placa de Cultura 96 poços (Thermo Scientific™ Nunc™ # 16008)	0.33cm ² /poço	200 µl/poço
Placa de Petri (35x10mm) (SPL Lifescience # 11035)	9.4cm ²	3ml
Tubos de cultura (Thermo Scientific™ Nunc™ # 146183)	-----	1ml
Frascos de cultura (SARSTEDT AG & Co # 83.1810)	25cm ²	7ml
Frascos de cultura (SARSTEDT AG & Co # 83.1813)	75cm ²	15ml

1-Referente ao volume total utilizado neste trabalho

2. Constituição dos *Stocks* Virais

De modo a garantir a padronização de todos os ensaios a realizar foi necessário não só definir a concentração celular como também constituir um *stock* das estirpes virais, para garantir a uniformidade do estudo.

O Laboratório de Resistência aos Antivirais da Unidade de Investigação e Desenvolvimento (UID) do Departamento de Doenças Infecciosas (DDI) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) dispõe de um *stock* de estirpes de vírus *Influenza*, isoladas a partir de amostras clínicas recolhidas no Hospital Curry Cabral. As alíquotas que constituem o *stock* encontram-se preservadas a -80°C.

Neste estudo utilizaram-se duas estirpes de vírus *Influenza A* pertencentes a diferentes subtipos: A/Portugal/50/2012, subtipo A(H₃N₂) e A/Portugal/55/2013, subtipo A(H₁N₁)pdm09.

A propagação das estirpes virais foi realizada em cultura celular MDCK-SIAT1 através de várias passagens em diferentes volumes de trabalho, existindo a necessidade de confirmar a presença e replicação do vírus através de reações de hemaglutinação. Recorreu-se ao cálculo da *tissue culture infectious dose* (TCID₅₀), quantidade de vírus capaz de provocar alterações em 50% das culturas celulares inoculadas, para definir a concentração das suspensões virais obtidas após a constituição do *stock* viral.

2.1. Propagação das Estirpes Virais

Os tubos e os frascos de cultura para propagação das estirpes são preparados 24 e 48 horas antes da inoculação do vírus, respetivamente, de acordo com os volumes descritos na Tabela 5. Observaram-se as culturas celulares, ao microscópio ótico de campo invertido, antes de iniciar qualquer procedimento, de forma a garantir que as células apresentavam as condições ideais para a inoculação (confluência de 90% e morfologia adequada).(75) A propagação das estirpes virais foi efetuada em três passagens sucessivas.

A primeira passagem consistiu na inoculação em tubo. O *meio de crescimento para infeção* foi decantado imediatamente antes da inoculação do vírus e o tubo inoculado com 200µl de estirpe viral. Utilizaram-se dois tubos controlo, aos quais se adicionaram 200µl de *meio suplementado*, pré-aquecido a 37°C. Após um período de 30 minutos, à temperatura ambiente, para adsorção do vírus à cultura celular, adicionou-se 1ml de *meio de infeção* (Tabela 4) e colocou-se a incubar a 35°C. Observou-se diariamente a presença ou não de destruição da monocamada celular. Após a total destruição da monocamada, fez-se uma centrifugação da suspensão a 3000-4000rpm durante 15 minutos, para remover os detritos celulares. Obteve-se o volume de 1ml de suspensão viral que nos permitiu realizar a inoculação em frascos de 25cm², ou seja, efetuar a segunda passagem do vírus. Antes de iniciar a segunda passagem do vírus, fez-se a avaliação da presença do vírus através de uma reação de hemaglutinação.

Na segunda passagem da suspensão viral procedeu-se à remoção do *meio de crescimento para infeção*, seguida da adição do volume de inóculo obtido anteriormente (1ml). Após a adsorção do vírus à cultura celular (30 minutos à temperatura ambiente), adicionou-se 6ml de *meio de infeção* (Tabela 4). Procedeu-se exatamente da mesma forma que na passagem em tubo. Do frasco pequeno (25cm²) resultam 7ml de suspensão viral.

Da suspensão viral resultante da passagem em frasco de 25cm², inocularam-se as monocamadas celulares em três frascos de 75cm². Após a remoção do *meio de crescimento para infeção* adicionou-se 2ml de inóculo. Segue-se o período de 30 minutos de adsorção. Adicionam-se 14ml de *meio de infeção* (Tabela 4) a cada frasco de 75cm². Observou-se diariamente o grau de destruição da monocamada celular. Após observação da destruição total da monocamada celular, o conteúdo de cada frasco é centrifugado (3000-4000rpm durante 15 minutos) individualmente. Efetuou-se a reação de hemaglutinação das suspensões virais para determinação do título em unidades hemaglutinantes. Após confirmação da presença do vírus

procede-se à junção e homogeneização dos 48ml de suspensão viral resultantes desta passagem. A suspensão viral foi distribuída em alíquotas de 500µl e conservadas a -80°C.

Todas as alíquotas obtidas, de ambas as estirpes em estudo, foram conservadas e manuseadas nas mesmas condições de forma a garantir a uniformização nas titulações e ensaios posteriores.

2.2. Reação de Hemaglutinação

O vírus *Influenza* não induz efeito citopático característico em culturas celulares, pelo que é necessário recorrer a testes complementares para a sua detecção. Consequentemente, para confirmar a replicação e presença do vírus em cultura celular realizaram-se reações de hemaglutinação.

Esta reacção baseia-se na capacidade que o vírus *Influenza* apresenta de aglutinar os eritrócitos, através da ligação da hemaglutinina aos recetores mucopolissacarídicos da membrana das hemácias. Esta ligação permite que não exista deposição dos eritrócitos, aquando da presença de partículas virais em suspensão. (2)

Neste estudo as reações de hemaglutinação foram realizadas com glóbulos de cobaio fornecidos, quinzenalmente, pelo Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Após receção da alíquota de 5ml de sangue de cobaio, este passa por um processo de lavagem em DPBS. Inicialmente homogeneiza-se manualmente o sangue e adiciona-se 10ml DPBS. Repete-se a homogeneização manual e coloca-se a centrifugar a 1800rpm durante 10 minutos. Remove-se o sobrenadante e repete-se o procedimento por mais duas vezes. Fez-se a diluição do concentrado eritrocitário de cobaio a 0,75% em DPBS. (77)

Nas reações de hemaglutinação realizadas no decurso deste trabalho, foram utilizadas microplacas de 96 poços de fundo em U (Sarstedt). Prepararam-se ao longo da placa, diluições sucessivas da suspensão viral desde 1:1 até 1:128, com factor de diluição de 2, em volumes de 50µl de DPBS (Figura 13).

Seguidamente adicionou-se 50µl de glóbulos de cobaio (0.75% em DPBS) a cada poço. As placas foram colocadas durante 45 minutos a 4°C, de forma a reduzir a atividade enzimática da neuraminidase sobre os receptores mucopolissacáridicos da membrana das hemácias.(2, 77)

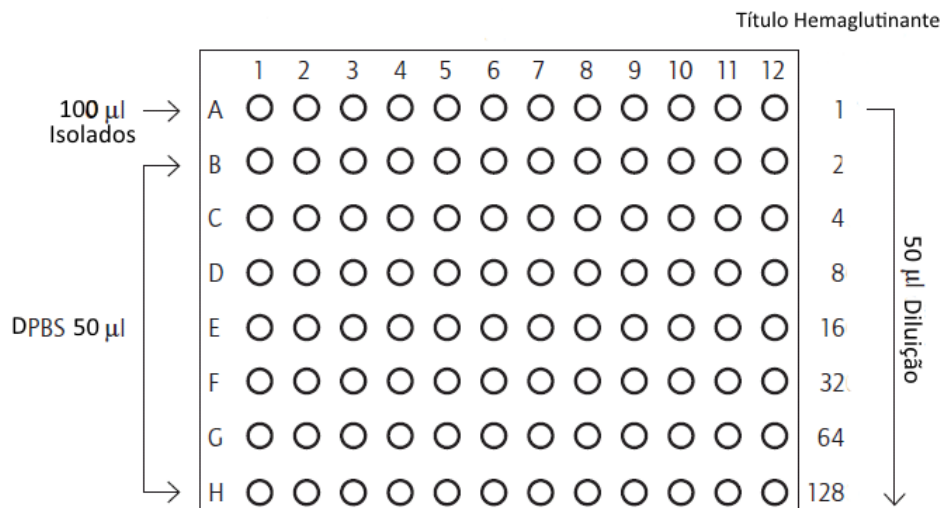


Figura 13- Reação de Hemaglutinação. De A a H estão representadas as diluições sucessivas de fator 2. De 1 a 11 são colocadas as suspensões virais a testar. Dois poços da coluna 12 foram usados com controle Negativo (ausência de suspensão viral). Adaptado de *World Health Organization*, 2011

Após o período de incubação faz-se a leitura da placa. Se a concentração de vírus for suficientemente alta haverá formação de múltiplas pontes entre as partículas virais e as hemácias, o que não permitirá a deposição dos glóbulos (Figura 14A). Aquando da ausência ou baixa concentração viral, temos uma reação negativa na qual se observa a formação de um botão ou anel no fundo do poço, formado pela deposição dos globulos (Figura 14B). O título, em unidades hemaglutinantes, é recíproco da maior diluição de vírus onde ainda é observável a aglutinação das hemácias.(77)

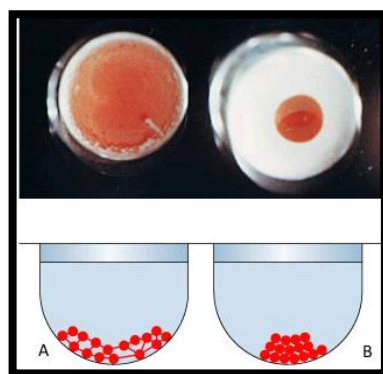


Figura 14- Reação de Hemaglutinação Positiva (A) e Negativa (B). Adaptado de: <http://classes.midlandstech.com/carterp/Courses/bio225/chap18/ss3.htm> a 1/9/2014

2.3. Determinação do TCID₅₀

Para a determinação do título viral recorreu-se ao cálculo do TCID₅₀, através do método de *Reed-Muench*. (78)

A determinação do TCID₅₀ das estirpes virais consistiu na infeção de culturas celulares de MDCK-SIAT1, em microplacas de cultura de 96 poços, preparadas 24 horas antes, de forma a obter monocamada confluyente. No processo de infeção, recorreu-se a diluições decimais das suspensões virais como representado na Figura 15A. As diluições foram preparadas num reservatório de 8 poços e posteriormente distribuídas pela placa.

O procedimento consistiu na inoculação 50µl de suspensão viral diluída, por poço, de acordo com Figura 15B. Manteve-se a placa à temperatura ambiente durante 30 minutos, para adsorção do vírus às células em cultura. Por fim adicionaram-se 150µl de meio de infeção a cada poço e colocou-se a incubar a 35°C na presença de 5% de CO₂ (dióxido de carbono).

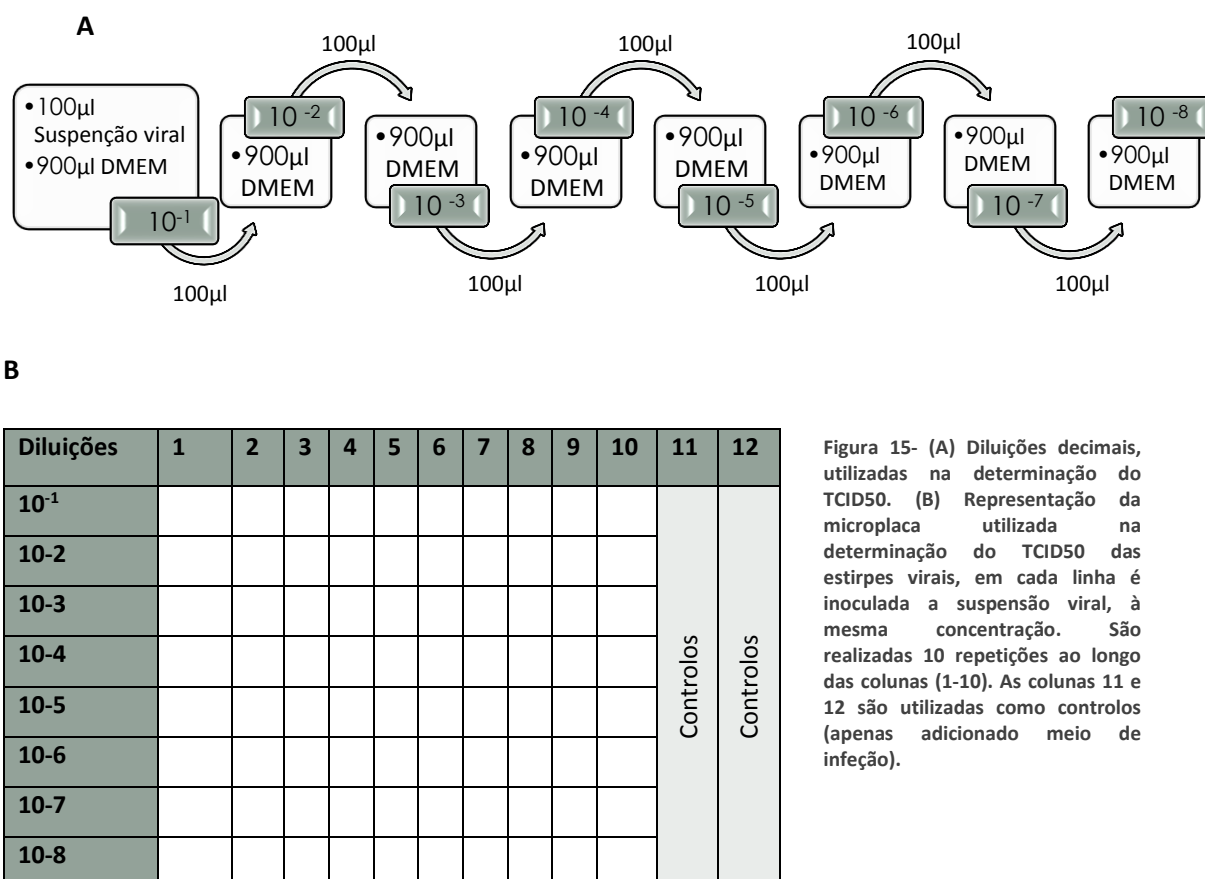


Figura 15- (A) Diluições decimais, utilizadas na determinação do TCID₅₀. (B) Representação da microplaca utilizada na determinação do TCID₅₀ das estirpes virais, em cada linha é inoculada a suspensão viral, à mesma concentração. São realizadas 10 repetições ao longo das colunas (1-10). As colunas 11 e 12 são utilizadas como controlos (apenas adicionado meio de infeção).

Fez-se a monitorização da placa diariamente durante três dias, com registo do grau de destruição de cada poço individualmente, de modo a avaliar a ação do vírus sobre as células. Tendo em conta os poços testemunha assim como a evolução da destruição de cada poço ao longo do tempo, fez-se a avaliação de acordo com a presença/ausência de destruição por ação do vírus. Determinou-se a concentração viral capaz de provocar alterações em 50% das culturas celulares inoculadas, ao fim de três dias de infeção, recorrendo ao método de *Reed-Muench*. A concentração viral será expressa em TCID₅₀/ml.(78)

Foram efetuadas no mínimo 3 repetições do ensaio, realizadas em paralelo de forma independente, para cada estirpe viral. A concentração viral das estirpes foi determinada através do cálculo da média das repetições do TCID₅₀ obtido.

Método de Reed-Muench

Para o cálculo do TCID₅₀ pelo método de *Reed-Muench* realizar-se diversos passos:

1. Registo do número poços com células infetadas e de poços com células não infetadas para cada diluição (Tabela 6- coluna 2 e 3);
2. Cálculo da frequência absoluta acumulada dos poços infetados (A), da menor para a maior diluição (Tabela 6- coluna 4);
3. Cálculo frequência absoluta acumulada dos poços não infetados (B), da maior para a menor diluição (Tabela 6- coluna 5);
4. Somatório das frequências absolutas acumuladas (A+B), para cada diluição(Tabela 6- coluna 6);
5. Cálculo da razão entre a frequência absoluta acumulada dos poços infetados e o somatório das frequências absolutas acumuladas em cada diluição. Valor expresso em percentagem (Tabela 6- coluna 7).

Tabela 6- Modelo para o cálculo do TCID₅₀ pelo método de Reed-Muench.

Diluição	Total de poços infetados	Total de poços não infetados	↑Σ Poços infetados (A)	↓Σ Poços não infetados (B)	↓Σ (A+B)	% [A/(A+B)]
10 ⁻¹	10	0	28	0	28	100,00%
10 ⁻²	10	0	18	0	18	100,00%
10 ⁻³	5	5	8	5	13	61,54%
10 ⁻⁴	2	8	3	13	16	18,75%
10 ⁻⁵	1	9	1	22	23	4,35%
10 ⁻⁶	0	10	0	32	32	0,00%
10 ⁻⁷	0	10	0	42	42	0,00%
10 ⁻⁸	0	10	0	52	52	0,00%

6. Determinação da distância proporcional entre as diluições em que se situa o valor de 50%, através da fórmula:

$$\frac{\% \text{ de poços positivos acima de } 50\% - 50\%}{\% \text{ de poços positivos acima de } 50\% - \% \text{ de poços positivos abaixo de } 50\%}$$

7. Dado que o valor encontrado é função logarítmica do fator de diluição é necessário corrigir a distância proporcional. Multiplica-se o valor obtido (distância proporcional) pelo negativo do \log_{10} do fator de diluição (10), ou seja multiplica-se por (-1)
8. O \log_{10} da diluição que corresponde ao TCID₅₀ é obtido adicionando o valor obtido anteriormente ao valor do \log_{10} da diluição acima dos 50%
9. A concentração viral será expressa em TCID₅₀/ml pelo que temos que calcular o TCID₅₀ presente em 50 μ l (volume utilizado).
10. Calcula-se o TCID₅₀ por ml.

Exemplo:

- 6) Distância proporcional:

$$\frac{\% \text{ de poços positivos acima de } 50\% - 50\%}{\% \text{ de poços positivos acima de } 50\% - \% \text{ de poços positivos abaixo de } 50\%} = \frac{61,54 - 50}{61,54 - 18,75} = 0,27$$

- 7) Correção da distância proporcional:

$$0,27 \times (-1) = -0,27$$

- 8) Na diluição $10^{-3,27}$, ou seja, em $5,37 \times 10^{-4}$ ml, temos 1 TCID₅₀

- 9) Cálculo de TCID₅₀ por ml:

$$\frac{1}{5,37 \times 10^{-4}} = 1,862 \times 10^3 \text{ TCID}_{50}$$

- 10) Cálculo do TCID₅₀ em 50 μ l de inoculo:

$$\frac{1,862 \times 10^3}{5 \times 10^{-2}} = 3,72 \times 10^4 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$$

3. Ensaios de Morte Celular

Após padronização de todos os parâmetros (concentração celular e virais) a utilizar nos ensaios de morte celular, pode realizar-se a infeção *in vitro*, das células MDCK-SIAT1, com as estirpes virais A/Portugal/50/2012 (H₃N₂), e A/Portugal/55/2013 (H₁N₁)pdm09, a diferentes concentrações ($6,13 \times 10^1$, $1,46 \times 10^3$ e $3,47 \times 10^4$ TCID₅₀/ml). O teste a que recorreremos para avaliar a morte celular total, será a medição da enzima lactato desidrogenase (LDH). A quantificação da apoptose será realizada através da utilização da coloração de Hoechst.

Fez-se ensaios em placas de Petri de 9,4cm² (Tabela 5), com a finalidade de analisar e quantificar, a cinética da morte celular total e da apoptose ao longo do tempo. Foram, preparadas 24 horas antes do processo de infeção, 30 placas de cultura celular de forma a obter uma confluência de 80%.

Selecionaram-se 24 placas nas quais as células apresentassem a morfologia e confluência adequada à realização dos ensaios. Fez-se a preparação das diluições virais em *meio suplementado*. Inocularam-se, em simultâneo, 6 placas por cada diluição com 300µl de suspensão viral e 6 placas controlo (300µl de *meio suplementado*). Após 30 minutos de adsorção do vírus às células removeu-se o inóculo, seguido da adição de 2ml de *meio de infeção* a cada placa. Todas as placas são colocadas, em simultâneo, na estufa de CO₂ a 37°C.

Estudou-se a morte celular total e a apoptose em 6 *time points* (8, 24, 32, 48, 56 e 72 horas pós-infeção). Em cada *time point* recolheram-se 4 placas (Controlo, $6,13 \times 10^1$, $1,46 \times 10^3$ e $3,47 \times 10^4$ TCID₅₀/ml). Para a medição da enzima lactato desidrogenase é removido o sobrenadante de cada placa individualmente e sujeito a centrifugação, utilizando-se seguidamente as placas para medição da apoptose por coloração de Hoescht.

3.1. Morte Celular Total

LDH é uma enzima solúvel presente no citoplasma das células. O aumento das concentrações de LDH no meio extracelular indica uma redução na integridade da membrana plasmática ou a morte celular.(79, 80)

Este teste tem por base uma reação química catalisada pela LDH na qual ocorre a oxidação do piruvato a lactato. Em simultâneo verifica-se a redução de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD⁺) a NADH. O NADH reage com um substrato (cloreto de iodofenil-nitrofenil tetrazolio (INT)), reduzindo-o a vermelho de formazan (Figura 16).

A colorimetria produzida pelo vermelho de formazan permitirá quantificar a morte celular total através da leitura no espectrofotómetro (*FLUO star OPTIMA*). A absorvância do vermelho de formazan é diretamente proporcional á atividade da LDH e à inviabilidade celular. (81, 82)

Para realização deste teste recorre-se a um *kit* comercial *CytoTox 96®Non-Radioactive Cytotoxicity Assay*, Promega.(83)

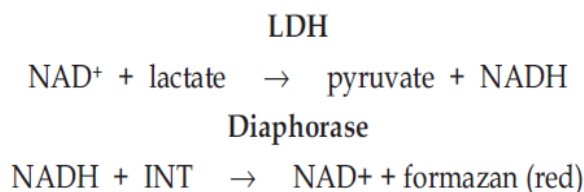


Figura 16. Reação química na qual se baseia o *kit CytoTox 96®Non-Radioactive Cytotoxicity Assay*, Promega. Fonte: Stevens, J, 2010

O procedimento consistiu na medição da LDH em cada *time point* (8, 24, 32, 48, 56 e 72 horas pós-infecção). Fez-se a recolha de 4 placas (Controlo, $6,13 \times 10^1$, $1,46 \times 10^3$ e $3,47 \times 10^4$ TCID₅₀/ml), das quais se removeu o sobrenadante. Seguidamente fez-se uma centrifugação a 1600 rpm durante 4 minutos, de modo a garantir a deposição dos resíduos celulares.

Numa placa de 96 poços, preta de fundo transparente, adicionou-se 50µl de substrato mix (componente do *kit*) a 50µl do sobrenadante previamente preparado. Após um período de incubação de 30 minutos à temperatura ambiente, na ausência de luz, foram adicionados 50µl de solução STOP (componente do *kit*). Seguido da medição da colorimetria no espectrofotómetro com o comprimento de onda de 490nm. Repetiu-se o procedimento para cada *time point*.

3.2. Apoptose

Com o objetivo de quantificar a apoptose recorreu-se à coloração de Hoescht. O procedimento é realizado em quatro etapas: fixação, coloração, montagem e observação ao microscópio de fluorescência.

A fixação permite interromper o metabolismo celular, e desta forma estabilizar as estruturas celulares, mantendo a integridade física e química das células. Neste trabalho utilizou-se a fixação química, recorrendo ao paraformaldeído (PFA) (*MERCK*) a 4% em DPBS.(84)

Na coloração recorreu-se ao corante de Hoechst 33258 (2'- (4 -hydroxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazole trihydrochloride hydrate) (Sigma), que tem a capacidade de penetrar a membrana plasmática das células fixadas e corar o DNA (Figura 17). Este corante possui fluorocromos que quando excitados (espectro de excitação na gama dos 346nm) emitem fluorescência (espectro de emissão na gama dos 460nm).(50, 53, 85, 86)

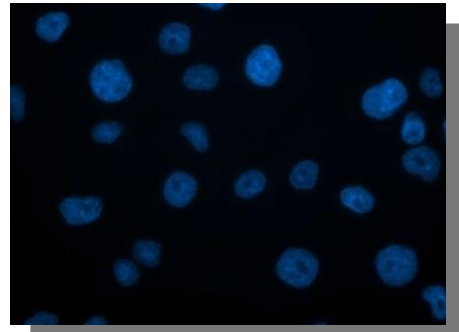


Figura 17- Células MDCK-SIAT1 coradas com Hoechst 33258

O meio de montagem utilizado em microscopia de fluorescência deve ter características específicas, tais como: não emitir fluorescência; proporcionar a maximização da fluorescência do fluorocromo; apresentar um índice de refração igual ao da lamela e ser transparente nos diferentes comprimentos de onda. Neste trabalho utilizou-se glicerol (MERCK, Darmstadt, Alemanha) em DPBS à proporção de 1:3, como meio de montagem. (87, 88)

A microscopia de fluorescência é caracterizada pela irradiação das células ou tecidos com luz ultravioleta intensa que, por sua vez, emitem no espectro da luz visível, o que faz com que a amostra fluorescente apareça brilhante sobre um fundo escuro. (88-90)

O procedimento que permite a determinação da apoptose foi realizado em 6 *time points* (8, 24, 32, 48, 56 e 72 horas pós-infecção). O processo inicia-se imediatamente após a remoção do sobrenadante para a medição da enzima lactato desidrogenase nas 4 placas infetadas às diferentes concentrações. Para a remoção das células e detritos celulares em suspensão efetuaram-se 3 lavagens com 1ml de DPBS pré-aquecido a 37°C, em cada placa. Seguidamente fez-se a fixação das células com 1ml de PFA a 4% em DPBS, em cada placa, durante 10 minutos. Para remover o excesso de fixador as placas são novamente sujeitas a 3 lavagens em DPBS aquecido a 37°C.

Seguiu-se a coloração adicionando-se, a cada placa, 1ml de corante de Hoechst 33258 (50µg/ml em DPBS) durante 5 minutos. Realizaram-se 3 lavagens com DPBS para remoção do excesso de corante.

Por fim colocou-se 25µl de meio de montagem (glicerol em DPBS à proporção de 1:3), seguido da aplicação de uma lamela (24mmx24mm). Todos os processos após a coloração foram realizados na ausência de luz direta.

As células foram observadas ao microscópio de epifluorescência (Axioskop, Zeiss), com filtro de DAPI (D360/40x) (Chroma Technology Corp) com comprimento de onda de 360nm. Recorreu-se à utilização de óleo de imersão e a observação celular foi efetuada na objetiva 40x.

Foram capturados em cada placa quatro campos aleatórios com o Software Cytovision (Versão 7.3.1 build 16, Leica Biosystems Richmond). Repete-se o procedimento nos diferentes tempos pós-infeção.

As células que se encontram no processo apoptótico apresentam características morfológicas evidentes tais como, o núcleo e a cromatina condensados e a fragmentação nuclear, como observado na Figura 18. Procedeu-se então à análise de dados através da contagem de células totais e em apoptose de modo a calcular a percentagem de células em apoptose em cada campo fotografado, para cada concentração viral nos diferentes tempos.

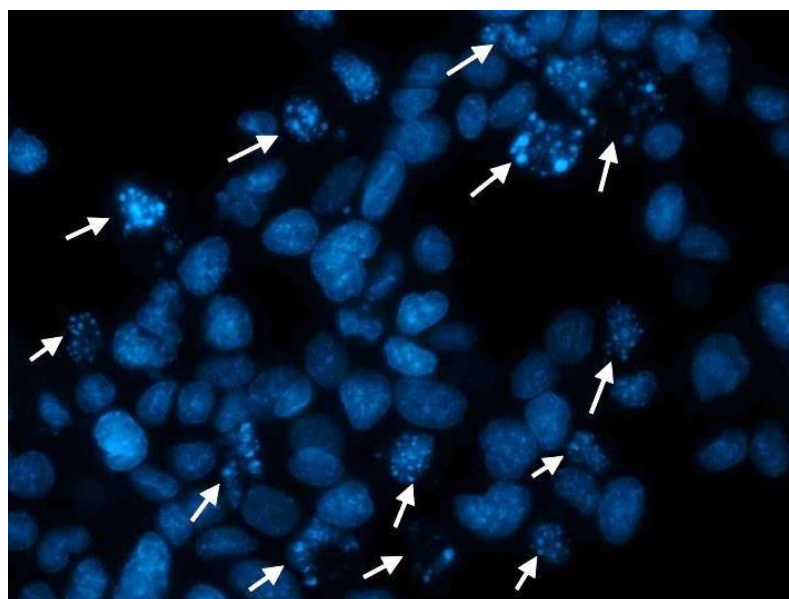


Figura 18 - Identificação de núcleos de células MDCK-SIAT1 em apoptose por coloração de Hoechst 33258

Na análise dos resultados foram considerados representativos, todas as placas cuja soma dos 4 campos continham no mínimo 100 células. Calculou-se individualmente a percentagem de células em apoptose, por campo. Em cada ensaio a percentagem de células em apoptose para cada concentração viral a cada *time point* foi calculado através da média dos quatro campos analisados.

3.3. Tratamento de Dados

Os dados recolhidos ao longo do trabalho foram compilados e analisados no programa *Microsoft Office Excel 2013*[®].

Na determinação do TCID₅₀, na medição da LDH e coloração de Hoescht foram realizados no mínimo três ensaios independentes, para cada condição. Os resultados foram analisados recorrendo-se ao cálculo de medidas de localização e de dispersão (média, mediana e quartis, desvio padrão da média, amplitude interquartil e coeficiente de variação).

Analisaram-se os resultados recorrendo ao teste *T-student* para avaliar a presença de diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$; $p < 0,01$) na cinética da morte celular total e na percentagem de células em apoptose, nos diferentes tempos pós-infeção: das culturas celulares infetadas relativamente ao controlo; entre as diferentes concentrações virais; entre as estirpes virais. A maioria dos valores descritos ao longo do trabalho estão expressos sob a forma de média \pm desvio padrão da média.

Resultados

Na sequência das metodologias aplicadas que visaram analisar quantitativamente a cinética da morte celular total e a apoptose em infecções por dois subtipos diferentes de vírus influenza do tipo A (A(H₃N₂) e A(H₁N₁)pdm09), procedeu-se à análise dos resultados.

Durante o estabelecimento da linha celular MDCK-SIAT1 foram aferidas as condições ideais de cultura para as células a usar para a constituição dos *stocks* virais, para a titulação da concentração viral e para os ensaios de morte celular total e de apoptose. Os *stocks* virais foram obtidos em 3 passagens consecutivas em células MDCK-SIAT1 conseguindo-se um título de $3,14 \times 10^4$ TCID₅₀/ml para a estirpe A/Portugal/50/2012 (H₃N₂) e de $2,54 \times 10^6$ TCID₅₀/ml para a estirpe A/Portugal/55/2013 (H₁N₁)pdm09.

Com base nos títulos obtidos decidiu-se proceder ao estudo das diferenças na morte celular total e apoptose usando 3 concentrações diferentes ($6,13 \times 10^1$, $1,46 \times 10^3$ e $3,47 \times 10^4$ TCID₅₀/ml) de cada subtipo em diferentes *time points* (8, 24, 32, 48, 56 e 72 horas pós-infecção).

1. Padronização da Concentração Celular

Com o objetivo de padronizar a concentração celular em função da confluência pretendida, num determinado período de tempo, realizaram-se ensaios teste em frascos de cultura, placas de 96 poços e placas de Petri (35x10mm), recorrendo a diversas concentrações celulares.

Para a determinação da concentração celular a utilizar na preparação dos frascos de cultura (25 e 75cm²), realizaram-se três repetições nas quais se utilizou entre 3×10^4 e 4×10^4 células/cm². Observando-se que a concentração de 4×10^4 células/cm² permite obter uma confluência de 90% em 48 horas, tal como pretendido.

Aquando da cultura de células em placas de 96 poços (0,33 cm²/poço) realizaram-se três ensaios teste, observando-se que das concentrações estudadas (entre 2×10^4 e 8×10^4 células/cm²) a concentração de 8×10^4 células/cm² é a ideal para obter uma confluência de 90% em 24 horas. Utilizando-se essa concentração no método de titulação das suspensões virais (TCID₅₀).

Na padronização da concentração celular ideal para a preparação das placas de Petri a utilizar nos ensaios de citotoxicidade e coloração de Hoescht, realizaram-se doze ensaios em placas de Petri (9,4cm²), recorrendo a concentrações desde 2×10^4 até 8×10^4 células/cm². Observou-se que a confluência pretendida (80% após 24 horas) se obtinha à concentração 5×10^4 células/cm².

Todas as concentrações aferidas e descritas neste ponto foram utilizadas ao longo de todo o trabalho após a confirmação da confluência da monocamada por microscopia ótica antes do início de cada procedimento.

2. Constituição dos *stocks* virais

2.1. Isolamento das Estirpes Virais

A propagação das estirpes virais foi realizada em cultura celular através de inoculação em tubo, seguindo-se a passagem para frasco de cultura de 25cm² e por fim inocularam-se três frascos de cultura de 75cm², existindo a necessidade de confirmar a presença e replicação do vírus através de reações de hemaglutinação.

Neste estudo foram utilizadas a estirpe A/Portugal/50/2012 (H₃N₂), proveniente de uma primeira passagem em células MDCK-SIAT1 com um título de 32 unidades hemaglutinantes e a estirpe A/Portugal/55/2013 (H₁N₁)pdm09 proveniente de uma segunda passagem em células MDCK-SIAT1 com um título de 8 unidades hemaglutinantes. Os resultados das reações de hemaglutinação realizados em cada passagem das estirpes virais estão representados na Tabela 7.

Tabela 7- Historial de propagação dos *stocks* virais com os respetivos resultados das reações de hemaglutinação.

Estirpe viral	Material de Cultura	Nº da Passagem (MDCK-SIAT1)	Resultado da HA*
A/Portugal/50/2012(H ₃ N ₂)	Tubo	2º	16
	Frasco 25cm ²	3º	4
	Frascos 75cm ²	4º	4
A/Portugal/55/2013(H ₁ N ₁)pdm09	Tubo	3º	4
	Frasco 25cm ²	4º	16
	Frascos 75cm ²	5º	> 128

* - Unidades hemaglutinantes utilizando na reação de hemaglutinação hemácias de Cobaio

Constituiu-se um *stock* viral de 91 alíquotas de 500µl, para cada estirpe viral, resultante do volume de suspensão viral obtido na 4ª passagem de A/Portugal/50/2012 (H₃N₂) e 5ª passagem para A/Portugal/55/2013 (H₁N₁)pdm09.

Após a congelação a -80°C das alíquotas que constituem o *stock*, recorreu-se ao ensaio de TCID₅₀ para determinar a concentração viral aplicando o método do *Reed-Muench*.

2.2. Determinação do TCID₅₀ das Estirpes Virais

A concentração viral, capaz de provocar destruição da monocamada em 50% das culturas celulares inoculadas, foi determinada pela média de três ensaios independentes após 72 horas de infeção. Obteve-se uma concentração de $3,14 \times 10^4$ TCID₅₀/ml para estirpe A/Portugal/50/2012 (H₃N₂) e de $2,54 \times 10^6$ TCID₅₀/ml para a estirpe A/Portugal/55/2013 (H₁N₁)pdm09.

Após determinado o TCID₅₀ das estirpes virais, definiu-se quais as concentrações virais a usar nos ensaios de citotoxicidade e de coloração de Hoescht de modo a avaliar a cinética da morte celular e da apoptose dos vírus *Influenza A*. As concentrações foram definidas de acordo com: o valor utilizado em estudos anteriormente desenvolvidos no Laboratório de Resistência aos Antivirais do INSA ($6,13 \times 10^1$ TCID₅₀/ml); o menor TCID₅₀ determinado entre as duas estirpes em estudo ($3,47 \times 10^4$ TCID₅₀/ml); o valor médio entre $6,13 \times 10^1$ e $3,47 \times 10^4$ TCID₅₀/ml ($1,46 \times 10^3$ TCID₅₀/ml).

3. Cinética da Morte Celular e da Apoptose Após Infecção pelos Vírus *Influenza A*

Após a padronização das concentrações celular e virais a usar nos ensaios de citotoxicidade e de coloração de Hoescht, pode fazer-se a avaliação da cinética da morte celular total e da apoptose em infecções por vírus *Influenza A*.

Sabe-se que a concentração viral pode interferir no tempo para o aparecimento de uma resposta à infecção. Por esta razão as células foram inoculadas com suspensões virais a diferentes concentrações ($6,13 \times 10^1$; $1,46 \times 10^3$ e $3,47 \times 10^4$ TCID₅₀/ml), a avaliação foi realizada através dos resultados obtidos por medições em diferentes tempos pós-infecção (8, 24, 32, 48, 56 e 72 horas pós-infecção (hpi)).

3.1. Cinética da Morte Celular Total

De modo a verificar a indução de efeitos citotóxicos em células MDCK-SIAT1, provocados pela infecção de vírus *Influenza A*, foi efetuada a medição da atividade da enzima LDH por espectrofotometria (490nm) nos diferentes tempos pós-infecção. O valor da absorvância medida é diretamente proporcional à rutura da membrana celular.

Os valores obtidos para a atividade da enzima LDH foram normalizados com o controlo correspondente de cada *time point* através do cálculo da razão da absorvância das células infetadas pela absorvância das células controlo (abs células infetadas/abs células controlo). Analisaram-se os resultados recorrendo ao cálculo de medidas de localização e de dispersão (média, mediana e quartis, desvio padrão da média, amplitude interquartil e coeficiente de variação).

3.1.1. Cinética da morte celular total após infecção com o vírus A/Portugal/50/2012 (H₃N₂)

A morte celular total induzida pelas diferentes concentrações da estirpe viral A/Portugal/50/2012 (H₃N₂) foi comparada com o controlo (Figura 19). Verificou-se que as células inoculadas com as concentrações virais $6,13 \times 10^1$ TCID₅₀/ml e $1,46 \times 10^3$ TCID₅₀/ml apresentam valores muito próximo do controlo até às 48hpi. A partir deste *time point* observou-se o aumento da razão entre libertação de LDH das células inoculadas e as células controlo.

Na maior concentração viral em estudo ($3,47 \times 10^4$ TCID₅₀/ml), os níveis de libertação de LDH mantiveram-se constantes até às 32 hpi, *time point* a partir do qual se observou o aumento dos níveis de LDH ($p < 0,01$) relativamente ao controlo. Às 56 hpi, à concentração viral de $3,47 \times 10^4$ TCID₅₀/ml, o valor estabiliza até as 72 hpi, ao passo que a tendência crescente se mantém nas concentrações $6,13 \times 10^1$ e $1,46 \times 10^3$ TCID₅₀/ml.

Nas células inoculadas com diferentes concentrações da estirpe viral A/Portugal/50/2012 (H₃N₂), observou-se que o *time point* no qual se verifica o aumento da libertação de LDH varia com a concentração viral inoculada. Registou-se às 32hpi o aumento da libertação de LDH nas células inoculadas com a maior concentração viral ($3,47 \times 10^4$ TCID₅₀/ml). Nas concentrações $6,13 \times 10^1$ e $1,46 \times 10^3$ TCID₅₀/ml o aumento apenas se verifica após as 48hpi, tomando sempre valores inferiores aos registados à concentração $3,47 \times 10^4$ TCID₅₀/ml.

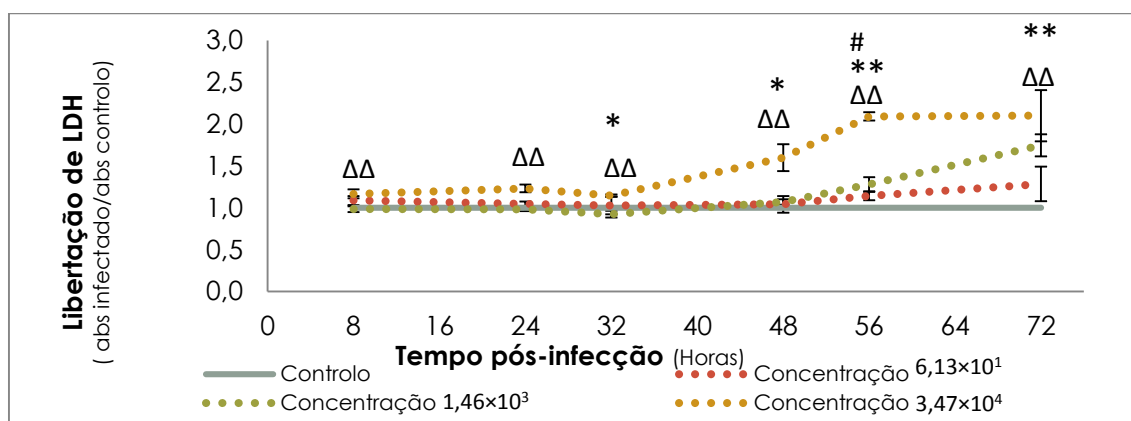


Figura 19- Libertação de LDH ao longo de 72 horas pós-infecção com a estirpe viral A/Portugal/50/2012 (H₃N₂). Os valores representados foram normalizados calculando a razão da absorvância nas células infetadas pela absorvância do respetivo controlo. Os resultados representam a média de seis ensaios independentes. As barras de erro referem-se ao desvio padrão da média. Recorreu-se ao teste T-student para avaliar a presença de diferenças estatisticamente significativas na morte celular total das células inoculadas nas diferentes concentrações: # diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a concentração $6,13 \times 10^1$ e o controlo; * e ** diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respetivamente) entre a concentração $1,46 \times 10^3$ TCID₅₀/ml e o controlo; Δ e ΔΔ diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respetivamente) entre a concentração $3,47 \times 10^4$ TCID₅₀/ml e o controlo.

3.1.2. Cinética da morte celular total após infecção com o vírus A/Portugal/55/2013 (H₁N₁)pdm09

Os resultados obtidos na avaliação da morte celular total após inoculação com as diferentes concentrações da estirpe viral A/Portugal/55/2013 (H₁N₁)pdm09, foram comparados com o controlo (Figura 20).

Na concentração $6,13 \times 10^1$ TCID₅₀/ml observa-se o aumento da libertação de LDH, relativamente ao controlo, das 8hpi até às 32 hpi. Às 32hpi o valor estabiliza até as 48 hpi, aumentando ($p < 0,01$) novamente a partir desse ponto.

Nas concentrações $1,46 \times 10^3$ e $3,47 \times 10^4$ TCID₅₀/ml os valores são próximos aos do controlo até às 32hpi. A partir deste *time point* a morte celular total aumenta ($p < 0,01$) em ambas as concentrações, relativamente ao controlo.

Nas células inoculadas, com diferentes concentrações da estirpe viral A/Portugal/55/2013 (H₁N₁)pdm09, observou-se que o *time point* no qual se verifica o aumento da libertação de LDH varia com a concentração viral inoculada. A partir das 32 hpi a libertação de LDH aumenta nas concentrações $1,46 \times 10^3$ e $3,47 \times 10^4$ TCID₅₀/ml, ao passo que na concentração $6,13 \times 10^1$ TCID₅₀/ml o aumento da libertação de LDH ocorre às 48hpi.

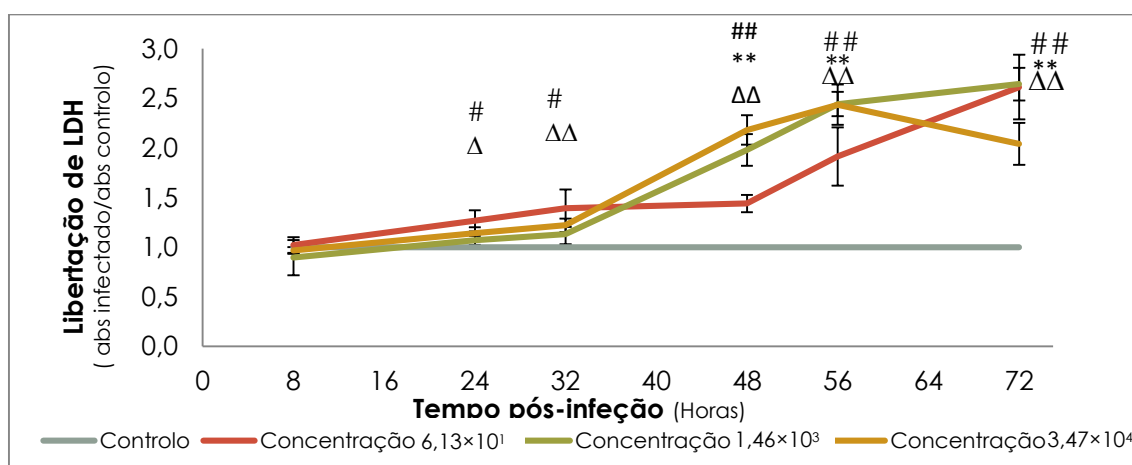


Figura 20- Libertação de LDH ao longo de 72 horas pós-infecção com a estirpe viral A/Portugal/55/2013(H₁N₁)pdm09. Os valores representados foram normalizados calculando a razão da absorvância nas células infetadas pela absorvância do respetivo controlo. Os resultados representam a média de seis ensaios independentes. As barras de erro são referentes ao desvio padrão da média. Recorreu-se ao teste *T-student* para avaliar a presença de diferenças estatisticamente significativas na morte celular total das células inoculadas nas diferentes concentrações: # e ## diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respetivamente) entre a concentração $6,13 \times 10^1$ e o controlo; * e ** diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respetivamente) entre a concentração $1,46 \times 10^3$ TCID₅₀/ml e o controlo; Δ e ΔΔ diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respetivamente) entre a concentração $3,47 \times 10^4$ TCID₅₀/ml e o controlo.

3.1.3. Comparação da morte celular total entre as estirpes virais

As estirpes virais em estudo apresentam um comportamento semelhante nas diferentes concentrações ainda que com valores de lise celular diferentes (Figura 21).

Na concentração $6,13 \times 10^1$ TCID₅₀/ml, a partir das 48hpi verifica-se um aumento da morte celular total (de 1,44 até 2,61) das células infetadas com A/Portugal/55/2013 (H₁N₁)pdm09, ao passo que na estirpe A/Portugal/50/2012 (H₃N₂) se verificam valores muito constantes, idênticos aos do controlo, ao longo do tempo. Observa-se ainda que a partir das 48 hpi há diferenças ($p < 0,05$) entre as duas estirpes, na morte celular total.

Quando comparados os resultados para a concentração $1,46 \times 10^3$ TCID₅₀/ml a estirpe A/Portugal/55/2013 (H₁N₁)pdm09 apresenta um crescimento lento até as 32hpi aumentando ($p < 0,01$) a partir desse ponto. A estirpe A/Portugal/50/2012 (H₃N₂) segue exatamente o mesmo padrão ainda que com valores inferiores aos registados para A/Portugal/55/2013(H₁N₁)pdm09 nas mesmas condições. Tal como verificado na diluição anterior as estirpes apresentam diferenças ($p < 0,01$) na morte celular total a partir das 48hpi.

Quando analisada a maior concentração viral em estudo ($3,47 \times 10^4$ TCID₅₀/ml) observou-se que ambas as estirpes apresentam valores de libertação de LDH que se mantêm constantes até às 32hpi, a partir deste *time point* registou-se o aumento da morte celular total. A estirpe A/Portugal/55/2013 (H₁N₁)pdm09 apresenta valores superiores aos observados na estirpe A/Portugal/50/2012 (H₃N₂) ($p < 0,05$ às 48hpi), no intervalo das 32-56hpi.

Em ambas as estirpes virais, verifica-se que o *time point* no qual se observa o aumento da libertação de LDH varia com a concentração viral inoculada. Quando analisada cada concentração individualmente, observa-se que nas duas estirpes a morte celular total aumenta no mesmo *time point*. Na concentração $6,13 \times 10^1$ TCID₅₀/ml a morte celular total aumenta a partir das 48hpi. Nas concentrações $1,46 \times 10^3$ e $3,47 \times 10^4$ TCID₅₀/ml a morte celular total aumenta a partir das 32hpi. Observa-se ainda que a partir das 32hpi, a estirpes A/Portugal/55/2013 (H₁N₁)pdm09 toma valores superiores de morte celular total em todas as concentrações virais estudadas.

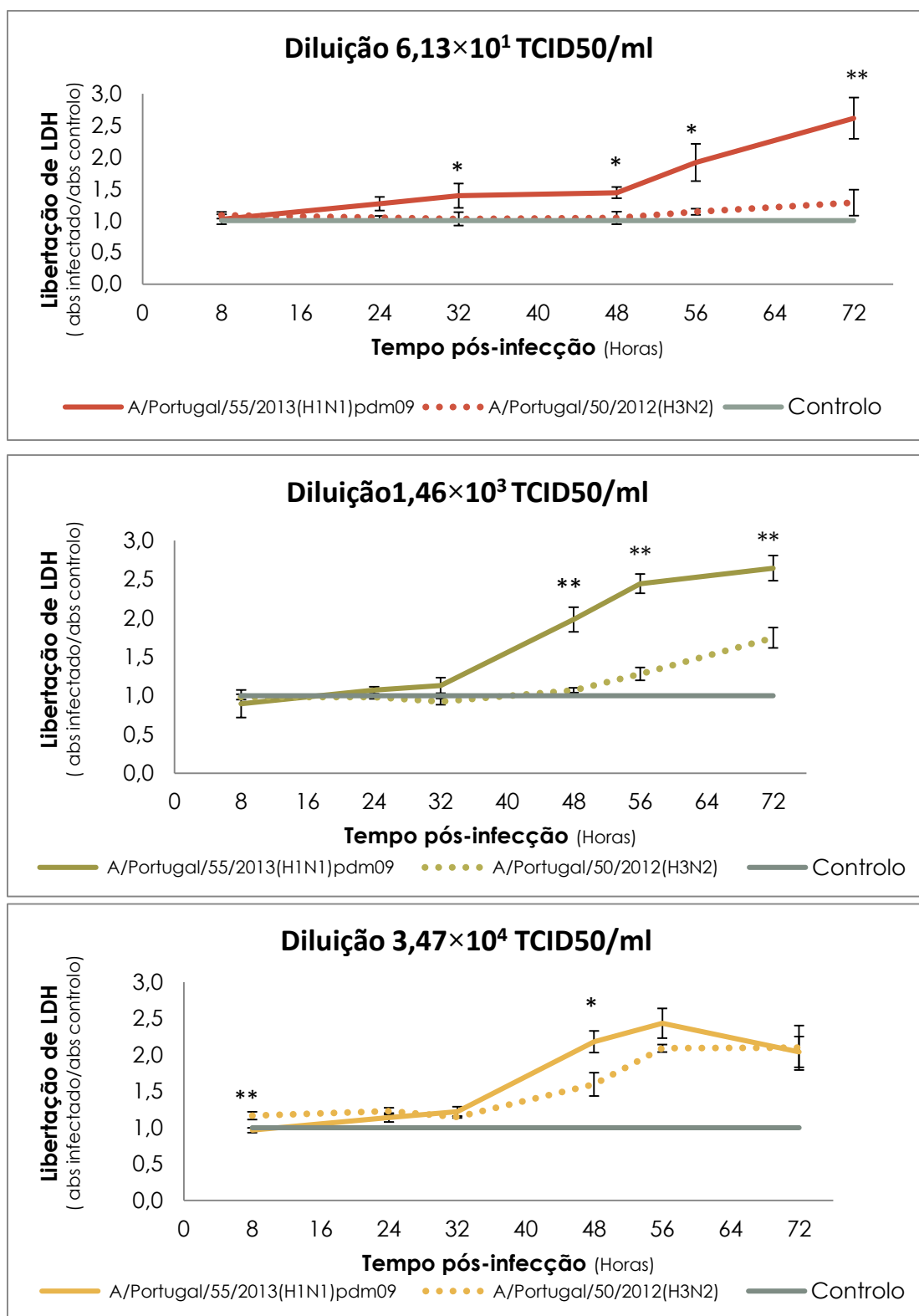


Figura 21- Liberação de LDH ao longo de 72 horas pós-infecção com as estirpes virais A/Portugal/50/2012(H₃N₂) e A/Portugal/55/2013(H₁N₁)pdm09 para cada diluição em estudo. Os valores representados foram normalizados calculando a razão da absorvância nas células infectadas pela absorvância do respetivo controlo. Os resultados representam a média de seis ensaios independentes. As barras de erro são respetivas ao desvio padrão da média. Recorreu-se ao teste T-student para avaliar a presença de diferenças estatisticamente significativas na morte celular total das células inoculadas nas diferentes concentrações: * e ** diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respetivamente) entre as estirpes virais.

3.2. Cinética da Apoptose na Infecção por Influenza A

Diversos estudos sugerem que os vírus influenza podem manipular a apoptose nas células infectadas através de mecanismos celulares distintos. As células que se encontram em processo apoptótico apresentam características morfológicas específicas tais como, o núcleo e a cromatina condensados e a fragmentação nuclear, como observado na Figura 22.

Com o intuito de verificar se a morte celular total observada na infecção com as estirpes virais A/Portugal/50/2012 (H₃N₂) e A/Portugal/55/2013 (H₁N₁)pdm09 seriam resultado da indução da apoptose recorreu-se à coloração de Hoechst e posterior identificação por microscopia de fluorescência das células em apoptose.

Analisaram-se os resultados recorrendo ao cálculo de medidas de localização e de dispersão (média, mediana e quartis, desvio padrão da média, amplitude interquartil e coeficiente de variação).

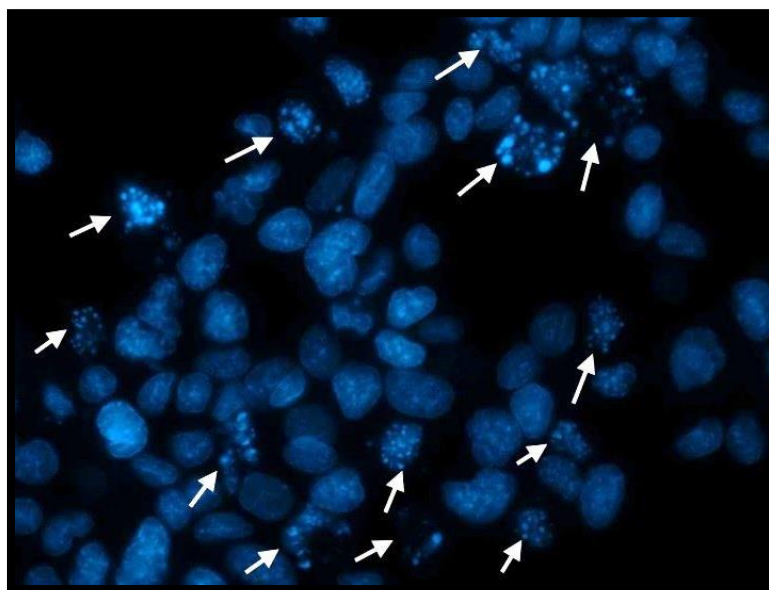


Figura 22- Núcleos de células MDCK-SIAT1 infectadas com vírus *Influenza A* do subtipo A(H₁N₁)pdm09 corados com Hoechst 33258 e observados por microscopia de fluorescência. Os núcleos das células em apoptose, característicos por apresentarem o núcleo e cromatina condensados e a fragmentação nuclear, encontram-se assinalados com uma seta.

3.2.1. Cinética da apoptose na infeção por A/Portugal/50/2012 (H₃N₂)

Nas culturas celulares infetadas com a estirpe A/Portugal/50/2012 (H₃N₂), detetou-se um aumento da percentagem de células em apoptose, ao longo do período pós infeção, comparativamente com o controlo (Figura 23).

Na concentração viral $6,13 \times 10^1$ a percentagem de células em apoptose manteve valores próximos aos do controlo até as 56hpi, aumentando ligeiramente, a partir deste *time point*.

Na concentração $1,46 \times 10^3$ TCID₅₀/ml, apenas se observou o aumento da percentagem de células em apoptose a partir das 48hpi, relativamente ao controlo ($p < 0,01$, às 56hpi). Às 72hpi, a percentagem de células em apoptose não é apresentada, uma vez que não se registou o mínimo de 3 ensaios, nos quais se obtivesse o mínimo de células contáveis.

Na maior concentração viral ($3,47 \times 10^4$ TCID₅₀/ml) observaram-se valores idênticos aos do controlo até às 24hpi, aumentando a partir deste *time point*. Às 56hpi atingiu-se o máximo (4,91%) de células em apoptose ($p < 0,01$, relativamente ao controlo).

Nas células inoculadas, com diferentes concentrações da estirpe viral A/Portugal/50/2012 (H₃N₂), observou-se que o *time point* no qual se verificou o aumento da percentagem de células em apoptose variou com a concentração viral inoculada. Verificou-se ainda que a percentagem de células em apoptose é diretamente proporcional à concentração viral inoculada.

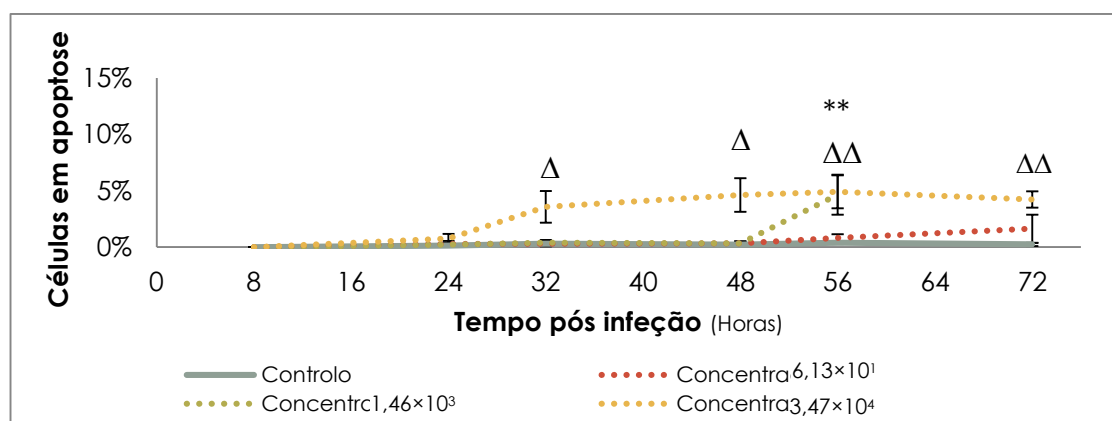


Figura 23 – Percentagem de células em apoptose ao longo de 72 horas pós-infeção com a estirpe viral A/Portugal/50/2012(H₃N₂). Os resultados representam a média de no mínimo três ensaios independentes ($n > 3$). As barras de erro são referentes ao desvio padrão da média. Recorreu-se ao teste T-student para avaliar a presença de diferenças estatisticamente significativas na apoptose das células inoculadas nas diferentes concentrações: ** diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$) entre a concentração $1,46 \times 10^3$ TCID₅₀/ml e o controlo; Δ e ΔΔ diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respetivamente) entre a concentração $3,47 \times 10^4$ TCID₅₀/ml e o controlo.

3.2.2. Cinética da apoptose na infeção por A/Portugal/55/2013 (H₁N₁)pdm09

Nas culturas celulares infetadas com a estirpe A/Portugal/55/2013 (H₁N₁)pdm09, detetou-se um aumento da percentagem de células em apoptose comparativamente com o controlo (Figura 24).

Em todas as diluições observou-se o aumento da percentagem de células em apoptose a partir das 32hpi, relativamente ao controlo. Na maior concentração viral o aumento é mais acentuado ($p < 0,01$ a partir das 32hpi, relativamente ao controlo) que o observado nas restantes concentrações em estudo. Na concentração viral $6,13 \times 10^1$ TCID₅₀/ml, às 72hpi, a percentagem de células em apoptose não é apresentada, uma vez que não se registou o mínimo de 3 ensaios, nos quais se obtivesse o mínimo de células contáveis.

Nos ensaios realizados com a estirpe viral A/Portugal/55/2013 (H₁N₁)pdm09 observa-se que a percentagem de células em apoptose é diretamente proporcional à concentração inoculada, ou seja, quanto maior a concentração inoculada maior a percentagem de células em apoptose.

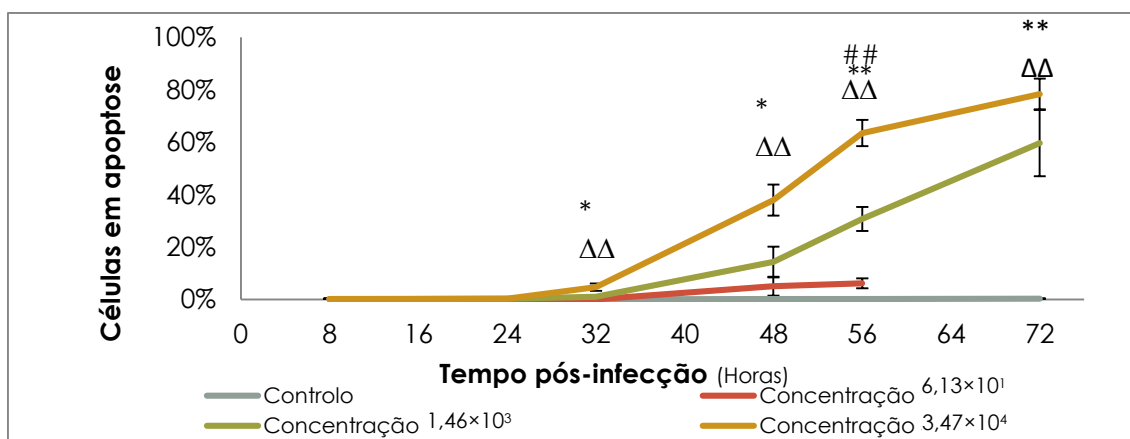


Figura 24 – Percentagem de células em apoptose, ao longo de 72 horas pós-infeção com a estirpe A/Portugal/55/2013 (H₁N₁)pdm09. Os valores representam no mínimo três ensaios independentes ($n > 3$). As barras de erro são referentes ao desvio padrão da média. Recorreu-se ao teste *T-student* para avaliar a presença de diferenças estatisticamente significativas na apoptose das células inoculadas nas diferentes concentrações: # e ## diferenças significativas ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respetivamente) entre a concentração $6,13 \times 10^1$ e o controlo; * e ** diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respetivamente) entre a concentração $1,46 \times 10^3$ TCID₅₀/ml e o controlo; Δ e ΔΔ diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respetivamente) entre a concentração $3,47 \times 10^4$ TCID₅₀/ml e o controlo.

3.2.3. Comparação das estirpes virais na cinética da apoptose

A comparação dos resultados da percentagem de células em apoptose obtidos para as estirpes dos dois subtipos em estudo permite-nos verificar que existem diferenças na indução da apoptose entre as estirpes virais (Figura 25). O valor máximo da média de células em apoptose para a estirpe do subtipo A(H₃N₂) foi de 4,91% e para a estirpe do subtipo A(H₁N₁)pdm09 foi de 78,36%.

Na menor concentração viral em estudo ($6,13 \times 10^1$ TCID₅₀/ml) observa-se que na estirpe A/Portugal/55/2013(H₁N₁)pdm09 a percentagem de células aumenta, das 32 às 56hpi, até ao valor máximo de 6,15%, enquanto que na estirpe A/Portugal/50/2012(H₃N₂) os valores registados são inferiores, apresentando o máximo de 1,64% às 72hpi.

Na concentração $1,46 \times 10^3$ TCID₅₀/ml verifica-se um aumento acentuado na percentagem de células em apoptose de 1,10 até 59,61%, a partir das 32hpi na estirpe A/Portugal/55/2013(H₁N₁)pdm09, enquanto na estirpe A/Portugal/50/2012(H₃N₂) apenas se observa um ligeiro aumento de 0,35 para 4,67%, a partir das 48hpi, ($p < 0,01$, às 56 hpi).

Na concentração $3,47 \times 10^4$ TCID₅₀/ml a percentagem de células em apoptose aumenta em ambas as estirpes virais a partir das 32hpi. Este aumento para a estirpe A/Portugal/55/2013 (H₁N₁)pdm09 é de 0,33 até 78,36%. Para estirpe A/Portugal/50/2012(H₃N₂) o aumento é de 0,77 até 4,226% ($p < 0,01$).

Em suma, a percentagem de células em apoptose é diretamente proporcional à concentração viral inoculada. Observando-se, a partir das 32hpi, que a percentagem de células em apoptose é maior aquando da infeção com a estirpe A/Portugal/55/2013 (H₁N₁)pdm09.

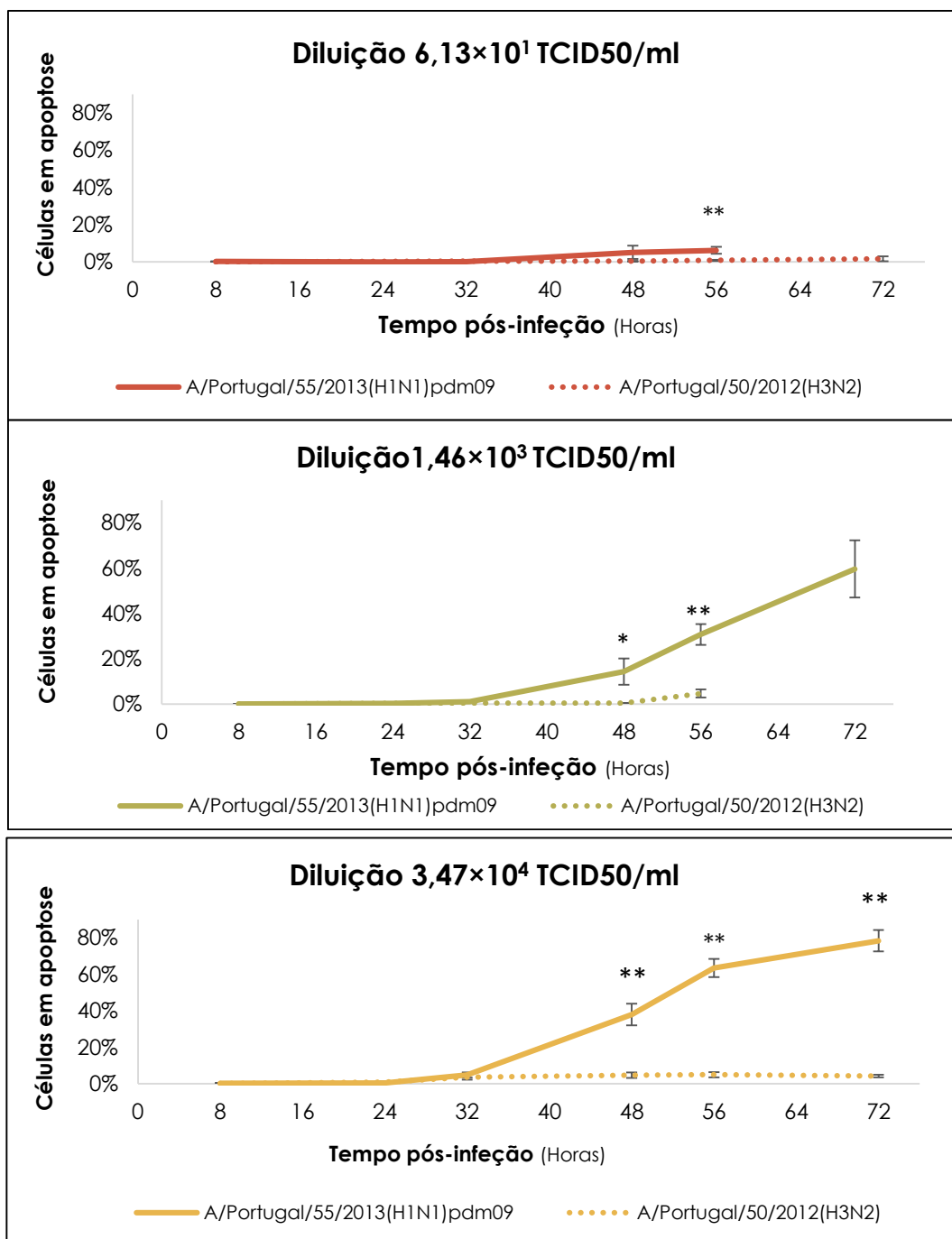


Figura 25- Comparação da percentagem de células em apoptose, ao longo de 72 horas pós-infecção entre a estirpe A/Portugal/50/2012(H₃N₂) e a estirpe A/Portugal/55/2013(H₁N₁)pdm09. Os valores representam a média de no mínimo de três ensaios independentes (n > 3). As barras de erro são respetivas ao desvio padrão da média. Recorreu-se ao teste T-student para avaliar a presença de diferenças estatisticamente significativas na apoptose das células inoculadas nas diferentes concentrações, entre as estirpes: * e ** diferenças estatisticamente significativas (p < 0.05 e p < 0.01, respetivamente).

3.3. Comparação da Morte Celular Total e Apoptose

Após a análise individual da citotoxicidade e a apoptose nos diferentes subtipos de vírus *Influenza A* em estudo, faz-se agora a análise comparativa dos resultados obtidos da morte celular total e da apoptose, em cada concentração individualmente Figura 26.

Observou-se que nas duas estirpes virais em estudo existem diferenças na morte celular total e na percentagem de células em apoptose e esse aumento não se reflete na Figura 26. Na estirpe A/Portugal/55/2013 (H₁N₁)pdm09, a libertação de LDH aumenta a partir das 8hpi enquanto que a percentagem de células em apoptose aumenta apenas a partir das 32hpi. No entanto há um aumento significativo da morte celular total a partir das 48hpi.

Na concentração $1,46 \times 10^3$ TCID₅₀/ml registou-se que o aumento da libertação de LDH e da percentagem de células em apoptose ocorrem em simultâneo. Registou-se o aumento de ambos os parâmetros às 32hpi na estirpe A/Portugal/55/2013 (H₁N₁)pdm09 e às 48hpi na estirpe A/Portugal/50/2012 (H₃N₂).

Na concentração $3,47 \times 10^4$ TCID₅₀/ml, na estirpe A/Portugal/50/2012 (H₃N₂), observa-se que o aumento da libertação de LDH é superior ao aumento da percentagem de células em apoptose, ao longo das 72hpi. No entanto, na estirpe A/Portugal/55/2013 (H₁N₁)pdm09 o aumento da libertação de LDH ocorre a partir das 8hpi, ao passo que a percentagem de células aumenta a partir das 24hpi.

Para ambos os parâmetros estudados o aumento observa-se entre as 24-32hpi na estirpe A/Portugal/55/2013 (H₁N₁)pdm09. Na estirpe A/Portugal/50/2012 (H₃N₂) o aumento ocorre apenas às 48hpi, exceto na maior concentração em que a percentagem de células em apoptose aumenta às 24hpi, ou seja, no mesmo *time point* que na estirpe do subtipo A(H₁N₁)pdm09. Tal como descrito nos resultados anteriores, em todas as concentrações estudadas a libertação de LDH e a percentagem de células em apoptose toma valores superiores para a estirpe A/Portugal/55/2013 (H₁N₁)pdm09.

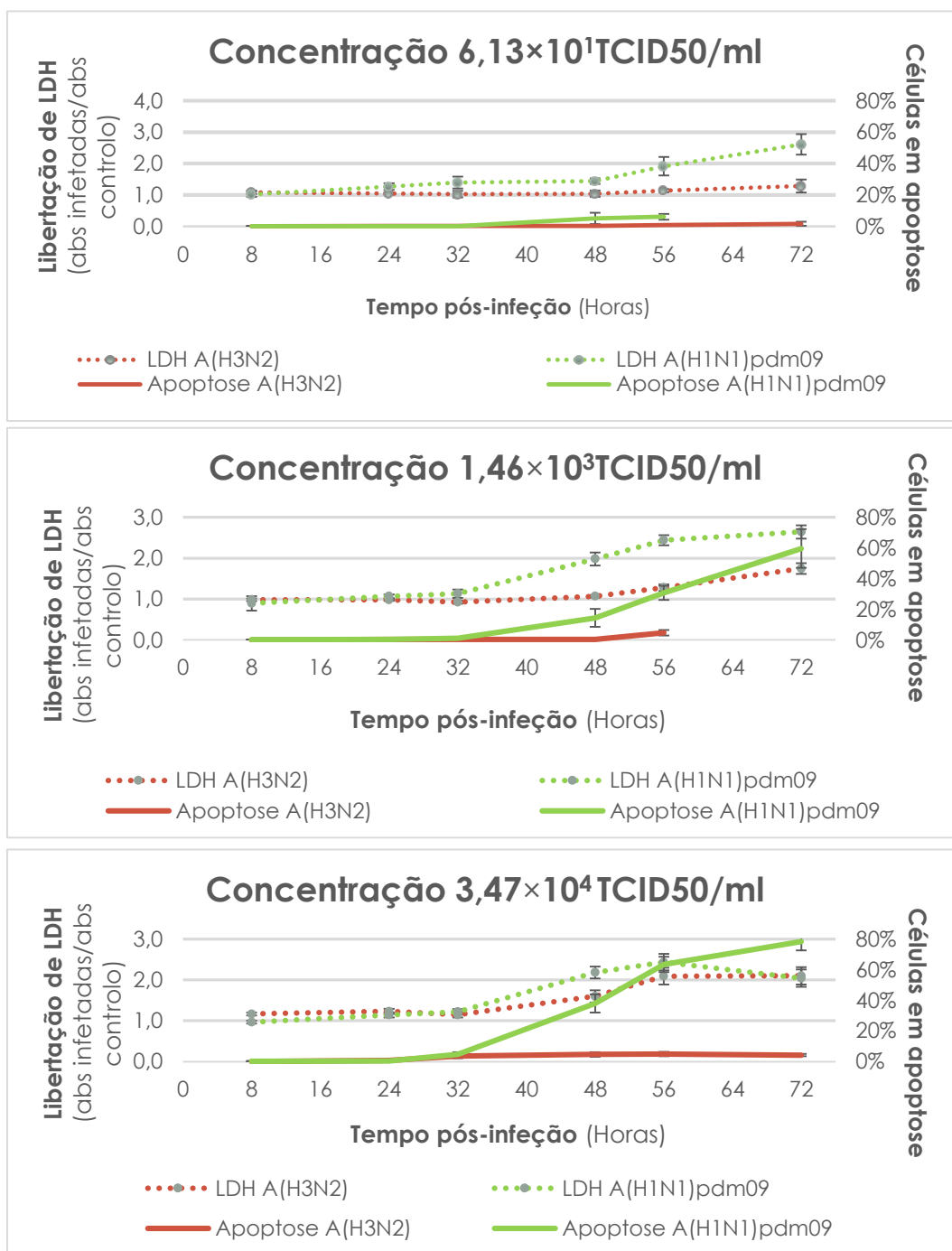


Figura 26- Comparação da liberação de LDH e da percentagem de células em apoptose, ao longo de 72 horas pós-infecção. Estão representados os resultados de ambas as estirpes (A/Portugal/50/2012(H₃N₂) e A/Portugal/55/2013(H₁N₁)pdm09), em cada concentração viral. Os valores representam a média de no mínimo de três ensaios independentes (n> 3).

Discussão

Os vírus *Influenza A* possuem diversos constituintes virais que desempenham funções anti e/ou pró-apoptóticas, e que permitem evadir a resposta imune do hospedeiro, através da interação com diversos mecanismos celulares. A presença/ausência destes constituintes pode estar na base das diferenças da cinética da apoptose dos vírus *Influenza A*. (7, 48, 49, 63, 65, 66, 91) Identificar e quantificar essas diferenças foi o principal objetivo deste estudo, sendo até ao momento, este o primeiro estudo em que se avalia a cinética da apoptose entre os vírus *Influenza A* dos subtipos A(H₃N₂) e A(H₁N₁)pdm09.

Os resultados obtidos no decorrer deste trabalho, permitiram observar que (1) numa fase inicial da infeção (até 24-32 hpi) não foi detetada morte celular nas células infetadas, em ambos os subtipos; e que (2) após esta fase inicial, há um aumento da morte celular que difere entre os dois subtipos em estudo: no subtipo A(H₁N₁)pdm09 a morte celular dá-se maioritariamente por apoptose, contrariamente ao que se observa no subtipo A(H₃N₂).

Nas várias condições estudadas para ambos os subtipos verificou-se que quer a libertação de LDH quer a percentagem de células em apoptose mantiveram-se perto dos valores obtidos para as células controlo nas primeiras 24-32hpi, indicando que, qualquer que seja a concentração viral em estudo ou o subtipo utilizado na infeção, existe uma inibição da morte celular nas primeiras horas pós-infeção. De facto, estes resultados vão ao encontro do que se encontra descrito em diversos estudos que sugerem que os vírus *Influenza A* têm a capacidade de inibir a morte celular numa fase inicial da infeção(48, 92) .

A única exceção observada ocorreu quando se infetaram células com a menor concentração do subtipo A(H₁N₁)pdm09, onde se observou um aumento da libertação de LDH após as 8 hpi. Este aumento de LDH não foi acompanhado de um aumento da percentagem de células em apoptose indicando uma possível morte por necrose. Este aumento da libertação de LDH na fase inicial da infeção pode estar associado à baixa concentração viral inoculada, resultando numa quantidade de constituintes virais insuficientes para a inibição da morte celular na fase inicial da infeção, no entanto outros estudos seriam necessários para confirmar estes resultados.

Na fase tardia da infeção, após as 24-32 hpi, verificou-se que o perfil de morte celular altera consoante (1) a concentração de vírus inoculada e (2) do subtipo de vírus influenza.

Em relação à concentração de vírus utilizada na inoculação, verificou-se que há uma maior libertação de LDH nas maiores concentrações virais inoculadas. Esta observação pode ser explicada pelo facto de quanto maior for o inóculo viral inicial maior será o *stress* intracelular, a replicação

viral e, consequentemente, a citotoxicidade extracelular. Estes resultados sugerem que o processo de replicação viral pode levar ao aumento da citotoxicidade do meio (64, 92), por outro lado, a eficiente replicação viral resulta na elevada *progeni* e consequentemente na maior quantidade de componentes virais que podem interferir com as vias apoptóticas e com a disponibilidade energética (ATP), induzindo a morte celular por apoptose ou por necrose.

Em relação ao subtipo de vírus influenza, verificou-se que no subtipo A(H₁N₁)pdm09 o aumento da libertação de LDH é acompanhado do aumento da percentagem de células em apoptose, indicando que na infeção com este subtipo, a morte celular total e a apoptose estão interligados. No entanto, verificou-se que no subtipo A(H₃N₂) o aumento da libertação de LDH não é acompanhado pelo aumento da percentagem de células em apoptose. Na infeção com o vírus do subtipo A(H₃N₂) verificou-se que a percentagem de células em apoptose manteve-se residual (até um máximo de 4,91%). Estes resultados revelam que existem diferenças na morte celular de células infetadas com vírus do subtipo A(H₁N₁)pdm09 e com vírus influenza do subtipo A(H₃N₂). Enquanto as células infetadas com vírus do subtipo A(H₁N₁)pdm09 parecem morrer maioritariamente por apoptose, as células infetadas com o vírus do subtipo A(H₃N₂) parecem morrer por necrose.

Este facto pode estar associado às diferenças na expressão de proteínas virais dependentes da estirpe/subtipo viral, tais como: a NA, esta proteína está indiretamente associada à indução da apoptose (93); a PB2 (associada a maior patogenicidade no subtipo A(H₁N₁)pdm09) possui uma mutação que aumenta a atividade da polimerase e a capacidade replicativa (7); PB1-F2, esta proteína desempenha funções pró-apoptóticas, e a sua expressão é dependente do subtipo, podendo estar truncada em alguns subtipos virais, sendo o caso do A(H₁N₁)pdm09. (63, 68)

As diferenças na cinética da morte celular total e da apoptose podem estar na base das diferenças de patogenicidade e virulência dos subtipos virais em estudo (64), uma vez que diversos autores referem que o subtipo A(H₁N₁)pdm09 apresenta maior capacidade replicativa, maior patogenicidade e virulência que outros subtipos, como por exemplo o A(H₃N₂). (66, 94)

Concluimos que com este estudo observou-se a inibição da morte celular nas primeiras 24-32 hpi, nos dois subtipos estudados. Após as 24-32hpi observam-se diferenças na morte celular induzida pelo subtipo A(H₁N₁)pdm09 e A(H₃N₂). Nomeadamente, em A(H₁N₁)pdm09 observa-se o aumento da indução da apoptose, contrariamente ao registado em A(H₃N₂).

Os dados obtidos não nos permitem evidenciar as razões das diferenças observadas porém, podemos sugerir as diferenças de fatores virais, de patogenicidade, virulência e na capacidade replicativa dos subtipos virais A(H₁N₁)pdm09 e A(H₃N₂). No entanto, para esclarecer e confirmar estes dados seria necessária a realização de mais estudos que incluiriam mais estirpes destes

subtipos virais, para confirmar as diferenças na cinética da morte celular entre os subtipos de vírus influenza. Seria igualmente importante recorrer a outro tipo de análise de morte celular, que nos permitiriam obter informações sobre as vias celulares que podem estar na origem destas diferenças. Futuramente poderia ainda ser interessante perceber o comportamento de outros subtipos de *Influenza A*, na cinética da morte celular, tentando desta forma contribuir para a investigação de novos alvos antivirais assim como para o desenvolvimento de novas estratégias de controlo dos vírus *Influenza A*.

Referências bibliográficas

1. Fauci A.S. Emerging and Reemerging Infectious Diseases: The Perpetual Challenge. *Academic Medicine : Journal of the Association of American Medical Colleges*. 2005;80(12):1079-85.
2. Rebelo de Andrade H., et al. Gripe Sazonal de Transmissão Zoonótica e Pandémica- Diagnóstico virológico. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 1ªed. Lisboa:CNdG, 2006.
3. Bresee J., Frederick G. Hayden, M.D. Epidemic Influenza—Responding to the Expected but Unpredictable. *The New England Journal of Medicine* 2013; 368:589–92.
4. Saxena S.K., Kotikalapudi R., Tiwari S., Muvva C. Influenza A(H1N1)pdm09 virus: therapeutics and challenges. *Future Virology*. 2012:947-50.
5. Rebelo de Andrade H., Diniz A., Froes F. Gripe. *Pneumologia SPd*, editor. Lisboa.
6. Cox N.J., Neumann G., Dinis R.O., Kawaoka Y. Orthomyxoviruses: Influenza. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections: John Wiley & Sons, Ltd*; 2010.
7. Schrauwen E.J., de Graaf M., Herfst S., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. Determinants of virulence of influenza A virus. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2014;33(4):479-90.
8. Wilschut J., Mcelhaney J., Palache A. Influenza Epidemic and Pandemics. In: Elsevier, editor. *Rapid Reference to Influenza A* Mosby Ltd. 2006. p. 49-72.
9. Fauci A.S. Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases: Influenza as a Prototype of the Host-Pathogen Balancing Act. *cell* 124 2006: 665-70.
10. Fenner F. History of Virology: Vertebrate Viruse. In: Mahy BWJ, Regenmortel MHVV, editors. *Encyclopedia of Virology*. Oxford, United Kingdom Elsevier; 2008. p. 455-8.
11. George F. Gripe. In: Almeida F., editor. *História de Doenças infecciosas*. Lisboa 2014. p. 85-126.
12. Shaw M.L., Palese P. Orthomyxoviruses: Molecular Biology. In: *Medicine MSSo*, editor. *Encyclopedia of virology*. III. New York,USA: Elsevier; 2008. p. 483-94.
13. Suzuki Y., Nei M. Origin and evolution of influenza virus hemagglutinin genes. *Molecular biology and evolution*. 2002;19(4):501-9.
14. Levinson W. Orthomixoviruses (Influenza Viruses) In: Companies L-M-H, editor. *Review of medical Microbiology and Immunology*. 12 ed. EUA 2012. p. 536-47.
15. Schrauwen E.J., Fouchier R.A. Host adaptation and transmission of influenza A virus in mammals. *Emerging microbes an infections*. 2014;3(e9).
16. Murphy B.R., Webster R.G. Orthomyxovirus. In: Fields BN, Knipe DM, editors. *Virology*. 2nd ed. New York: Raven Press; 2001.
17. Palese P., Shaw M.L. Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe DMH, Peter M, editor. *Fields Virology*, 5th Edition. 2007. p. 1647-93.
18. Schrauwen E.J., Fouchier R.A. Host adaptation and transmission of Influenza A viruses in mammals. *Emerg Microbes Infect*. 2014;3:e9.
19. Jawetz, Melnick, Adelberg. Orthomixovírus(Vírus Influenza). In: Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, editors. *Microbiologia Médica*. 24 ed. São Paulo: Mc Graw Hill; 2009. p. 533-45.
20. IFPMA. Nature of the Influenza Virus 2014 [7/5/2014]. Available from: <http://www.ifpma.org/resources/influenza-vaccines/the-influenza-virus/the-influenza-virus.html>.
21. Vasin A.V., Temkina O.A., Egorov VV, Klotchenko SA, Plotnikova MA, Kiselev OI. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: an overview of recently discovered proteins. *Virus research*. 2014;185:53-63.
22. Wise H.M., Foeglein A., Sun J., Dalton R.M., Patel S., Howard W., et al. A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *Journal of Virology*. 2009;83(16):8021-31.

23. Chen W., Calvo P.A., et al. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. . *Nature Medicine*. 2001:1306-12.
24. Fodor E., Mingay L.J., Crow M., Deng T., Brownlee G.G. A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase promotes the generation of defective interfering RNAs. *Journal of Virology*. 2003;77(8):5017-20.
25. Jagger B.W., Wise H.M., Kash J.C., Walters K.A., Wills N.M., Xiao Y.L., et al. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science*. 2012;337(6091):199-204.
26. Sacramento P.R. Diversidade genética da Neuraminidase de vírus Influenza A, isolados de crianças internadas na cidade de São Paulo, de 1995 a 2006. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2010.
27. Martins N.R.S. Influenza Aviária: Uma revisão dos últimos dez anos. *Revista Brasileira Ciência avic*. 2001:97-140.
28. Suzuki Y. Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2005;28(3):399-408.
29. Wise H.M., Hutchinson E.C., Jagger B.W., Stuart A.D., Kang Z.H., Robb N., et al. Identification of a novel splice variant form of the influenza A virus M2 ion channel with an antigenically distinct ectodomain. *PLoS Pathogens*. 2012;8(11):e1002998.
30. de Jong M.D., Hien T.T. Avian influenza A (H5N1). *Journal Clinical Virology*. 2006;35(1):2-13.
31. Lamb R., Krug R. *Orthomyxoviridae: the viruses and their replication*. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Monath TP, Melnick JL, et al., editors. *Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p. 1353-95.
32. Pielak R.M., Chou J.J. Influenza M2 proton channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2011;1808(2):522-9.
33. Muramoto Y., Noda T., Kawakami E., Akkina R., Kawaoka Y. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA. *J Virol*. 2013;87(5):2455-62.
34. Collier L. *Human Virology*. Third edition ed. New York: Oxford University; 2006.
35. Samji T. Influenza A: understanding the viral life cycle. *The Yale Journal of Biology and Medicine*. 2009;82(4):153-9.
36. Wilschut J., Mcelhaney J., Palache A. *The Influenza Vírus: Structure and Replication*. In: Elsevier, editor. *Rapid Reference to Influenza A* Mosby Ltd. Title; 2006. p. 27-47.
37. Weis W., Brown J.H., Cusack S., Paulson J.C., Skehel J.J., Wiley D.C. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature*. 1988;333(6172):426-31.
38. Ito T., Couceiro J.N., Kelm S., Baum L.G., Krauss S., Castrucci M.R., et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *Journal of Virology* . 1998;72(9):7367-73.
39. Goto H., Kawaoka Y. A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human influenza A virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(17):10224-8.
40. Sidorenko Y., Reichl U. Structured model of influenza virus replication in MDCK cells. *Biotechnol Bioeng*. 2004;88(1):1-14.
41. Flint S.J., Enquist L.W., Racaniello V.R., Skalka A.M. *Principles of Virology – Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses* 2nd Edition ed. Washington 2004.
42. Steinhauer D.A., Skehel J.J. Genetics of influenza viruses. *Annual review of genetics*. 2002;36:305-32.
43. Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews* 1992:152-79.
44. Li W., Shi W., Qiao H., Ho S.Y., Luo A., Zhang Y., et al. Positive selection on hemagglutinin and neuraminidase genes of H1N1 influenza viruses. *Journal of Virology* . 2011;8:183.

45. Hui E.K. Reasons for the increase in emerging and re-emerging viral infectious diseases. *Microbes and infection / Institute Pasteur*. 2006;8(3):905-16.
46. Vilanova M., Ferreira P. *Imunologia da Infecção*. In: Lidel, editor. *Fundamentos de Imunologia*. 1. Lisboa 2007. p. 339.
47. Wilschut J., Mcelhaney J., Palache A. The Immune Response to Influenza Infection. In: Elsevier, editor. *Rapid Reference to Influenza A* Mosby Ltd. Title; 2006. p. 79-95.
48. Takizawa T., Nakanishi Y. Role and Pathological Significance of Apoptosis Induced by Influenza Virus Infection *Antimicrobial Agents*. 2010(2):22-5.
49. Kreijtz J.H., Fouchier R.A., Rimmelzwaan G.F. Immune responses to influenza virus infection. *Virus research*. 2011;162(1-2):19-30.
50. Solá S. , Pedro T., Ferreira H. Apoptose: Uma questão de vida ou de morte. In: Bastos RGeC, editor. *Biologias*; Lisboa 2001.
51. Hengartner M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407(6805):770-6.
52. Melino G., Knight R.A., Nicotera P. How many ways to die? How many different models of cell death? *Cell death and differentiation*. 2005;12 Suppl 2:1457-62.
53. Grivicich I., Brondani R.A. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2007;53(3):335-43.
54. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. In: Health Nlo, editor. *Toxicology Pathology*. USA 2007. p. 495–516.
55. Okada H., Mak T.W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nature reviews Cancer*. 2004;4(8):592-603.
56. Iegler U., Groscurth P. Morphological Features of Cell Death 2004-06-01.124-8.
57. Blankenberg F.G. In vivo detection of apoptosis. *Journal of Nuclear Medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2008;49 Suppl 2:81S-95S.
58. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Peter W. Apoptose. In: Artmed, editor. *Biologia Molecular da Célula*. São Paulo 2010. p. 1115-29.
59. Nicholson D.W., Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends in Biochemical Sciences*. 1997;22(8):299-306.
60. Fadeel B., Orrenius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *Journal of Internal Medicine*. 2005;258(6):479-517.
61. Sola S., Aranha M.M., Steer C.J., Rodrigues C.M. Game and players: mitochondrial apoptosis and the therapeutic potential of ursodeoxycholic acid. *Current issues in Molecular Biology*. 2007;9(2):123-38.
62. Hail N., Kim H.J., Lotan R. Mechanisms of fenretinide-induced apoptosis. *Apoptosis*. 2006;11(10):1677-94.
63. Herold S., Ludwig S., Pleschka S., Wolff T. Apoptosis signaling in influenza virus propagation, innate host defense, and lung injury. *Journal of Leukocyte Biology*. 2012;92(1):75-82.
64. Price G.E, Smith H., Sweet C. Differential induction of cytotoxicity and apoptosis by influenza virus strains of differing virulence. *Journal of General Virology*. 1997;78(11):2821-9.
65. Ehrhardt C., Wolff T., Pleschka S., Planz O., Beermann W., Bode J.G., et al. Influenza A Virus NS1 Protein Activates the PI3K/Akt Pathway To Mediate Antiapoptotic Signaling Responses. *Journal of Virology*. 2007;81(7):3058-67.
66. Hale B.G., Steel J., Medina R.A., Manicassamy B., Ye J., Hickman D., et al. Inefficient Control of Host Gene Expression by the 2009 Pandemic H1N1 Influenza A Virus NS1 Protein. *Journal of Virology*. 2010;84(14):6909-22.
67. Ehrhardt C., Seyer R., Hrincius E.R., Eierhoff T., Wolff T., Ludwig S. Interplay between influenza A virus and the innate immune signaling. *Microbes and Infection*. 2010;12(1):81-7.
68. Chen C.J., Chen G.W., Wang C.H., Huang C. H., Wang Y.C., Shih S.R. Differential Localization and Function of PB1-F2 Derived from Different Strains of Influenza A Virus. *Journal of Virology*. 2010;84(19):10051-62.

69. Matrosovich M., Matrosovich T., Carr J., Roberts N.A., Klenk H.D. Overexpression of the alpha-2,6-sialyltransferase in MDCK cells increases influenza virus sensitivity to neuraminidase inhibitors. *Journal of Virology*. 2003;77(15):8418-25.
70. Oh D.Y., Barr I.G., Mosse J.A., Laurie K.L. MDCK-SIAT1 cells show improved isolation rates for recent human influenza viruses compared to conventional MDCK cells. *Journal Clinical Microbiology*. 2008;46(7):2189-94.
71. Alves E.A., Guimarães A.C.R. Cultivo Celular. In: EPSJV, editor. *Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde*. 2. Rio de Janeiro 2010. p. 215-53.
72. Public Health England. *Fundamental Techniques in Cell Culture*. 2nd ed 2010.
73. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. *Junções Celulares, Adesão Celular e Matriz Extracelular*. In: Artmed, editor. *Biologia Molecular da célula 5ª edição*. Porto Alegre 2010. p. 1133-78.
74. Collection ATC. MDCK (NBL-2) (ATCC® CCL-34™) EUA2014 [13/02/2014]. Available from: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-34.aspx?geo_country=pt#characteristics
75. World Health Organization . Virus isolation in cell culture. In: WHO, editor. *Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza*. Geneve: Suíça; 2011. p. 35-8.
76. Technologies L. Trypan Blue Solution, 0.4% (Gibco®) 2014 [13/02/2014]. Available from: <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/15250061#citationsList>.
77. World Health Organization. Identification of the Haemagglutinin Subtype of Viral Isolates by Haemagglutination Inhibition Testing. In: WHO, editor. *Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza*. Geneve, Suíça: WHO; 2011. p. 43-51.
78. World Health Organization. Serological diagnosis of influenza by microneutralization. In: Organization WH, editor. *Manual for the diagnosis and virological surveillance of influenza*. Geneve, Suíça: WHO; 2011. p. 63-72.
79. Haslam G. W.D., Kitos P. A. . Estimating the number of viable animal cells in multi-well cultures based on their lactate dehydrogenase activities. *Cytotechnology*: Kluwer Academic Publisher; 2000. p. 63–75.
80. Company C.C. LDH Cytotoxicity Assay Kit Item No 10008882. USA: Ann Arbor; 2013. p. 5.
81. Andrade M. Avaliação de efeitos citotóxicos, morfológicos e ultrastruturais de microcistinas em células Vero. Porto: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto 2007.
82. Lopes H. *Enzimas no laboratório clínico aplicações diagnósticas* 1998.
83. Stevens J. CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Technical Bulletin. In: Corporation P, editor. USA 2010. p. 19.
84. Caputo L.F.G, Gitirana B., Manso P. *Técnicas histológicas. Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde*. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fundação Oswaldo Cruz; 2010. p. 93-101.
85. Zhang G.H., Gurtu V., Kain S.R., Yan G.C. Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *Biotechniques*. 1997;23(3):525-&.
86. Sigma-Aldrich. bisBenzimide H 33258 2014 [cited 2014 20/2/2014]. Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/b1155?lang=pt®ion=PT>
87. Heimer G.V., Taylor C.E. Improved mountant for immunofluorescence preparations. *J Clin Pathol*. 1974;27(3):254-6.
88. Buchwalow I.B., Böcker W. *Immunohistochemistry: Basics and Methods: Basics and Methods*. Germany 2010.
89. Milioli E. “Avaliação citogenética de tumores mamários”. 2008.
90. Verma R.S. *Human Chromosomes - Principles and Techniques*. 2a, editor. New York: McGraw-Hill, Inc; 1995.
91. Ozawa M., Basnet S., Burley L.M., Neumann G., Hatta M., Kawaoka Y. Impact of Amino Acid Mutations in PB2, PB1-F2, and NS1 on the Replication and Pathogenicity of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza Viruses. *Journal of Virology*. 2011;85(9):4596-601.

92. Hale B.G, Randall R.E., Ortín J., Jackson D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *Journal of General Virology*. 2008;89(10):2359-76.
93. Schultz-Cherry S, Dybdahl-Sissoko N, Neumann G, Kawaoka Y, Hinshaw VS. Influenza virus NS1 protein induces apoptosis in cultured cells. *Journal of Virology*. 2001;75(17):7875-81.
94. Huang S.S.H., Banner D., Fang Y., Kanagasabai T., Kelvin D.J., et al. Comparative Analyses of Pandemic H1N1 and Seasonal H1N1, H3N2, and Influenza B Infections Depict Distinct Clinical Pictures in Ferrets. *PLoS ONE*. 2011;6(11):e27512.